

# **Untersuchungen zur Rolle der Depolarisation in der Auslösung der Insulinsekretion**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Michael Belz  
aus Berlin

1. Referent: Prof. Dr. Ingo Rustenbeck

2. Referent: Prof. Dr. Uwe Panten

eingereicht am: 23.01.2013

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.04.2013

Druckjahr 2013

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Lehner Z., Stadlbauer K., Adorjan I., Rustenbeck I., Belz M., Fenzl A., de Cillia V.A.M., Gruber D., Bauer L., Frobel K., Brunmair B., Luger A., Fürsinn C.; Mechanisms of antihyperglycaemic action of efaroxan in mice: time for reappraisal of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic antagonism in the treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2012 Nov; 55(11):3071-82. Epub 2012 Aug 18.

Willenborg M., Belz M., Schumacher K., Paufler A., Hatlapatka K., Rustenbeck I.;  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent desensitization of insulin secretion by strong potassium depolarization, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jul; 303(2):E223-33. Epub 2012 May 1.

Willenborg M., Hatlapatka K., Ghaly H., Belz M., Panten U., Rustenbeck I.; Studies of first phase insulin secretion using imposed plasma membrane depolarization, *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jan 1; 3:662-79. Review.

### **Tagungsbeiträge**

Belz M., Hatlapatka K., Paufler A., Schumacher K., Willenborg M., Rustenbeck I.;  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent desensitization of insulin secretion by strong potassium depolarization, *Diabetologia*, Volume 55, Issue 1 Supplement, S1-S538, P413, 48. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD) in Berlin (2012).

Belz M., Hatlapatka K., Paufler A., Schumacher K., Willenborg M., Rustenbeck I.;  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent desensitization of insulin secretion by strong potassium depolarization, *Diabetologie und Stoffwechsel*, Ausgabe S 01 Volume 7, S 37, P-39, 47. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) in Stuttgart (2012).

Belz M., Schumacher K., Willenborg M., Hatlapatka K., Rustenbeck I.; Stimulation and inhibition of insulin secretion by KCl depolarization, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 383 (Suppl1):1-112, P091, 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) in Frankfurt/Main (2011).

Belz M., Schumacher K., Willenborg M., Hatlapatka K., Rustenbeck I.; Stimulation and inhibition of insulin secretion by KCl depolarization, Diabetologie und Stoffwechsel, Ausgabe S 01, Volume 6, S 71, P199, 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) in Leipzig (2011).

*Meiner Familie gewidmet*

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2009 bis Januar 2013 am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Betreuung von

Herrn Prof. Dr. Ingo Rustenbeck,

bei dem ich mich sehr herzlich für die interessante Themenstellung und die permanente hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit bedanke. Zudem realisierten Sie, Herr Rustenbeck, mir eine individuelle Organisation meiner Arbeit, was mir sehr wichtig war – vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. a.D. Dr. Uwe Panten für die Übernahme zur Erstellung eines Gutachtens meiner Arbeit.

Insbesondere danke ich vor allem meiner Arbeitsgruppe für ein sehr harmonisches Arbeitsverhältnis, was für mich einen wichtigen Beitrag für das produktive Forschen hatte. Allen voran danke ich Dr. Michael Willenborg, der mich stets als hilfreicher „Co-Mentor“ unterstützte und in alle für diese Arbeit notwendigen Techniken einarbeitete. Natürlich danke ich Frau Sabine Warmbold für die Einarbeitung in die Patch-Clamp-Technik und Frau Verena Lier-Glaubitz für die Einarbeitung in die Mikrofluoreszenzmikroskopie. Des Weiteren bekunde ich meinen Dank an Dr. Kathrin Hatlapatka, Kirstin Schumacher, Carolin Rattunde, Angela Hahlbohm und Susanne Hornig, die jeweils auf ihre besondere Art und Weise stets für geistreiche Unterhaltungen und individuelle Motivationsspritzen sorgten.

Natürlich danke ich all denen, die vielleicht nicht wissenschaftlich meine Arbeit beeinflussten, mich dennoch durch meine Promotionszeit begleiteten, in dem sie mich mental unterstützten, bei Rat und Tat zur Seite standen, mitfieberten oder einfach für den nötigen Ausgleich sorgten, um neue Kraft und Motivation zu tanken. Dazu zählen an erster Stelle meine besten Freunde Dr. Jan Dreher, Jens Henneberg, Matthias Koch, Konstantin Kuschel, Stefan Lödige und Marcus Berbalk, die in allen Lebenslagen jederzeit ein offenes Ohr für mich haben. Ich bin unglaublich dankbar und froh Euch zu haben!

Dr. Christian Enge danke ich für seine engagierte Unterstützung an meinen Zukunftsplänen.

Ich danke Sara Barile (Grazie mille per il tuo sostegno morale e per la splendida vacanza (aprile 2011) in Italia!), Marco Gudella, Jan Harbecke, Dr. Phillip Hasemann, Yven Heerde, Dr.

## Danksagung

---

Carlos van Hemelrijck, Alexandra Kiefel, Dr. Christian Prühs, Anne Ripperger und Florian Taentzler, die jeweils auf ihre spezielle Art und Weise, in welcher Form auch immer, einen für mich wichtigen Beitrag leisteten.

Für den sportlichen Ausgleich gilt mein Dank an das ganze Niedersachsen-Team des Landesapothekerverbandes Niedersachsen, den Dienstags-Hallenkickern und zuletzt meinen Asseln EC Freunden Tobias Enge, Nils-Erik Meyer und Florian Witt.

Den allergrößten Dank widme ich meiner Mutter, meinem Bruder und den Rest meiner großen Familie für ihre stetige Unterstützung während meiner gesamten Zeit in Braunschweig!

## Inhalt

1	Einleitung .....	7
1.1	Diabetes mellitus.....	7
1.2	Pathogenetische Mechanismen des Typ 2 Diabetes: Insulinresistenz versus Insulinsekretionsdefizit .....	10
1.3	Die physiologische Regulation der Insulinsekretion .....	13
2	Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Isolierung der Pankreasinseln, Einzelzellgewinnung aus NRMI-Mäusen und deren Kultivierung .....	19
3.1.1	Verwendete Lösungen .....	19
3.1.2	Kulturmedien für die Zellkultur.....	20
3.1.3	Isolierung der Langerhans'schen Inseln aus NMRI-Mäusen.....	22
3.2	Patch-Clamp-Versuche.....	25
3.2.1	Verwendete Lösungen und Materialien .....	25
3.2.2	Aufbau des Messstands .....	28
3.2.3	Patch-Clamp-Technik und Ablauf eines Patch-Clamp-Experiments .....	30
3.3	Mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pankreasinseln der Maus .....	37
3.3.1	Medien für mikrofluorimetrische Messungen.....	37
3.3.2	Fluoreszenz ionensensitiver Farbstoffe .....	39
3.3.3	Messstandaufbau für mikrofluorimetrische $\text{Ca}^{2+}$ -Messung .....	43
3.4	Mikrofluorimetrische Messung des cytosolischen pH-Wertes in Pankreasinseln der Maus.....	49
3.4.1	Medien für mikrofluorimetrische Messungen des cytosolischen pH-Wertes ([pH] <sub>i</sub> ).....	49
3.4.2	Der Fluoreszenz-pH-Indikator BCECF-AM.....	50



3.4.3	Messung des cytosolischen pH-Wertes .....	53
3.5	Stammlösungen und Versuchslösungen .....	54
3.6	Statistik.....	56
4	Resultate .....	57
4.1	Versuche zum Verhältnis von Aktionspotential zum Plateaupotential .....	57
4.2	Unterschied in den Mechanismen des Calciums-Anstiegs durch 15 und 40 mM Kaliumchlorid .....	64
4.3	Abhängigkeit der Depolarisation durch 40 mM KCl von der extrazellulären $\text{Na}^+$ - Konzentration.....	71
4.4	Versuche zur Repolarisation .....	74
4.5	Wirkung der Depolarisation durch $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalblockade auf die cytosolische Calciumkonzentration im Vergleich mit der Depolarisation durch KCl .....	78
4.6	Wirkung der Depolarisation auf den cytosolischen pH-Wert.....	89
5	Diskussion.....	94
6	Zusammenfassung .....	106
7	Literaturverzeichnis.....	109
8	Abkürzungsverzeichnis.....	119

## **1 Einleitung**

### **1.1 Diabetes mellitus**

Der Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für heterogene Regulationsstörungen des Stoffwechsels, deren Leitsymptom die chronische Hyperglykämie ist. Die Ursache ist entweder eine gestörte und somit unzureichende Insulinsekretion oder eine unzureichende Insulinwirksamkeit (Insulinresistenz) oder eine Kombination von beiden. Die chronische Hyperglykämie führt über die diabetesspezifische Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen, vorwiegend an Augen (Retinopathie), Nieren (Nephropathie) und Nervensystem (Neuropathie) und über die diabetesassoziierte Makroangiopathie zu Folgeschäden vorwiegend an Herz (z.B. Myocardinfarkt), Gehirn (z.B. Schlaganfall) und den peripheren Arterien (periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)). Nach folgenden Diagnosekriterien der American Diabetes Association (ADA) liegt ein Diabetes mellitus vor, wenn eine venöse Plasmaglukosekonzentration im nüchternen Zustand (Fastenperiode von mindestens 8 Stunden) von  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l) oder wenn zwei Stunden nach peroraler Gabe von 75 g Glucose (OGTT = oraler Glucose-Toleranztest)  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) diagnostiziert werden (Kerner et al. 2004).

Der Diabetes mellitus breitet sich immer weiter und schneller aus, sodass er mit zu den größten Volkskrankheiten gehört. Weltweit gibt es im Jahr 2010 nach Angaben der Internationalen Diabetes Föderation (IDF Diabetes Atlas 4th edition, 2009) 285 Mio. Menschen im Alter von 20 bis 79 Jahren mit Diabetes, das sind 6,6 Prozent der Weltbevölkerung. Im Jahr 2030 steigt nach Schätzungen die Zahl auf 438 Mio. Menschen, was 7,8 Prozent entspricht (IDF Diabetes Atlas 4th edition, 2009). Auch in Deutschland sind laut der IDF im Jahr 2010 rund 9 Prozent der Bevölkerung (ca. 7,5 Mio.) zwischen 20 und 79 an dieser Stoffwechselkrankheit erkrankt. Davon sind ca. 90% an Diabetes Typ 2 und 5-10% an Typ 1 Diabetes erkrankt (Hauner 1998, Giani et al. 2000). Insgesamt wird der Diabetes mellitus in 4 Kategorien (Typen) klassifiziert (siehe Tabelle 1.1) (Alberti und Zimmet 1998).

Der Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas (Kerner et al. 2004). Für das Entstehen wird das Zusammenwirken von erblicher Veranlagung, äußeren Faktoren (z. B. bestimmte Virusinfektionen) und einer Fehlsteuerung des Immunsystems

verantwortlich gemacht. Im Verlauf der Erkrankung richten sich körpereigene Immunzellen (T-Lymphozyten) gegen die insulinproduzierenden Beta-Zellen und zerstören diese (Cnop et al. 2005; Pugliese 2012). Daraus folgt ein Insulinmangel mit einem Insulinmangelsyndrom, das gekennzeichnet ist durch die klassischen Zeichen Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust. Das Spektrum der Manifestation des Insulinmangels reicht von der gestörten Glucosetoleranz über mäßig erhöhte Nüchternblutglucosewerte bis hin zur abrupt einsetzenden absoluten Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung und möglichem Bewusstseinsverlust (Kerner et al. 2004).

### **I. Typ 1 Diabetes**

(B-Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt)

- A. Immunologisch vermittelt                      B. Idiopathisch

### **II. Typ 2 Diabetes**

(kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken)

### **III. Andere spezifische Diabetes-Typen**

#### A. Genetische Defekte der Beta-Zellfunktion, z.B.

- Chromosom 12, HNF-1 $\alpha$  (frühere Bezeichnung MODY 3)
- Chromosom 7, Glucokinase (GCK) (frühere Bezeichnung MODY 2)
- Chromosom 20, HNF-4 $\alpha$  (frühere Bezeichnung MODY 1)
- Mitochondriale DNA

#### B. Genetische Defekte der Insulinwirkung, z.B.

- Typ A Insulinresistenz • Lipatrophischer Diabetes u.a.

#### C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas, z.B.

- Pankreatitis • Trauma, Pankreatektomie • Neoplasie • Zystische Fibrose • Hämochromatose

#### D. Endokrinopathien, z. B.

- Akromegalie • Cushing-Syndrom • Glukagonom • Phäochromozytom • Hyperthyreose
- Somatostatinom • Aldosteronom

#### E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert, z.B.

- Neuroleptika (insbes. Clozapin, Olanzapin) • Glukokortikoide • Schilddrüsenhormone
- Diazoxid •  $\beta$ -adrenerge Agonisten • Thiazide • Phenytoin • Alpha-Interferon

#### F. Infektionen, z. B.

- Kongenitale Rötelninfektion • Zytomegalievirus

#### G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes, z.B.

- „Stiff-Person“-Syndrom • Antiinsulinrezeptorantikörper

#### H. Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome, z.B.

- Down-Syndrom • Turner-Syndrom • Chorea Huntington • Porphyrie u.v.m.

### **IV. Gestationsdiabetes**

Tabelle 1.1 Nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus (nach ADA, 1997; (Alberti und Zimmet 1998))

Der Diabetes mellitus Typ 1 wurde früher auch als juveniler Diabetes bezeichnet, weil er bevorzugt im Kindes- und Jugendalter auftritt – er kann aber auch im Erwachsenenalter auftreten und wird dann als „LADA“ (latent autoimmune diabetes in adults) bezeichnet. Bei Patienten mit Typ 1 Diabetes-Manifestation im Erwachsenenalter bleibt über Jahre eine Restfunktion der Beta-Zellen erhalten, die eine ketoazidotische Stoffwechselentgleisung verhindert (Martin und Kolb 1998). Das Therapiekonzept besteht aus den Komponenten Insulintherapie, Ernährung, Schulung und psychosoziale Betreuung. Dabei ist die essentielle Therapie eine lebenslange Insulin-Substitution, um zum einen das Risiko für schwere Stoffwechselentgleisungen (schwere Hypoglykämien und/oder schwere Hyperglykämien mit Ketoazidose oder Coma diabeticum) zu reduzieren und zum anderen Prävention der oben genannten diabetesspezifischen Folgeschäden zu bewirken.

Der weltweit häufigste Form des Diabetes mellitus ist der Typ 2 - Prävalenz stark steigend. Bei dieser Erkrankung kommt es selten zu schweren Stoffwechselentgleisungen, aber häufig zu diabetesspezifischen Mikro- und Makroangiopathien. Früher trat der Typ 2 Diabetes meist erst im fortgeschrittenen Alter auf, daher stammt auch die (nicht mehr korrekte!) Bezeichnung Altersdiabetes. Mittlerweile findet sich nun der Typ 2 Diabetes zunehmend auch bei jüngeren Erwachsenen und immer öfter sind sogar Jugendliche betroffen. Die Vererbung spielt beim Typ 2 Diabetes eine wichtige Rolle, dies weiß man aus Vergleichsbeobachtungen an Zwillingen. Das Erkrankungsrisiko für eineiige Zwillinge von Typ 2 Diabetikern beträgt 50-90% (Newman et al. 1987). Es besteht also eine genetische Determinierung und in der letzten Zeit haben sich genetische Risikofaktoren identifizieren lassen (Pal und McCarthy 2012). Die meisten dieser Risikofaktoren betreffen die Funktion der Beta-Zelle, so z.B. ein SNP (single nucleotide polymorphism) in TCF7L2 (Transcription factor 7-like 2) oder einem Beta-Zell spezifischen Zinktransporter (SLC30A8) (Saxena et al. 2006; van Hoek et al. 2008). Doch insgesamt sind Risikogene wahrscheinlich nur für einen geringen Prozentsatz der Typ 2 Diabetes-Fälle verantwortlich. Darum geht man heutzutage davon aus, dass es in der Regel nicht allein auf der Grundlage von Vererbung zur Erkrankung kommt. Denn ein Typ 2 Diabetes entwickelt sich überwiegend dann, wenn ungünstige äußere Einflüsse bzw. ein ungünstiger Lebensstil neben der genetischen Disposition hinzukommen. Auslöser eines Typ 2 Diabetes sind starkes Übergewicht (Adipositas), v.a. durch Fehlernährung (zu kalorien- und fettreich), und zu wenig körperliche Bewegung, oft begleitet von erhöhten Blutfettwerten (Dyslipidämie) sowie Hypertonie im Rahmen des

metabolischen Syndroms (Kahn et al. 2005). Auch Hormonelle Störungen und Stress, oder seltener auch Medikamente, können die Entstehung dieser Form des Diabetes begünstigen. Seit einigen Jahren werden die Insulinresistenz, die durch die genannten Risikofaktoren aufgrund des Lebensstilwandels immer mehr verstärkt wird, und/oder einer Dysfunktion in den Beta-Zellen als die Krankheitsursachen angesehen.

Für die medikamentöse Therapie eines Typ 2 Diabetespatienten verfügt der Markt über ein breites Spektrum an nicht-insulinotropen sowie insulinotrop wirkenden Arzneistoffen. Dabei wirken sich v.a. Biguanide,  $\alpha$ -Glucosidasehemmer und Glitazone positiv auf die diabetologische Stoffwechsellaage aus, ohne direkt eine Insulinsekretion auszulösen. Arzneistoffe, die dagegen eine sekretionssteigernde Funktion mit verschiedenen Mechanismen bewirken, sind Sulfonylharnstoffe sowie Glinide und Inkretin-Mimetika meistens in Kombination mit Dipeptidyl-Peptidase-4-Inhibitoren. Bei den allgemeinen Therapiezielen sollten möglichst alle der nachfolgenden Kriterien berücksichtigt werden: Erhalt bzw. Wiederherstellung der Lebensqualität, Symptommfreiheit, Vermeidung von Akutkomplikationen (Infektionen, Koma, Hypoglykämie u.a.), Vermeidung von Folgekrankheiten und Risikofaktor-Intervention. Diese Ziele müssen individuell angepasst werden, z.B. in Abhängigkeit von Komorbiditäten, Lebenserwartung und Lebensalter (Matthaei et al. 2011).

## **1.2 Pathogenetische Mechanismen des Typ 2 Diabetes: Insulinresistenz versus Insulinsekretionsdefizit**

Der Typ 2 Diabetes mellitus, an dem ca. 90% der Patienten mit Diabetes leiden, ist ein heterogenes Krankheitsbild, bei dem es durch eine periphere Insulinresistenz und eine gestörten Insulinsekretionskinetik zu einer Störung der Glucosehomöostase, aber auch des Fett- und Aminosäurestoffwechsels kommt. Dabei kann der Beitrag der Resistenz und des Sekretionsdefizits variieren (DeFronzo 1988; Abdul-Ghani et al. 2006).

Die periphere Insulinresistenz ist ein zentraler Faktor in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes. Eine Insulinresistenz liegt dann vor, wenn eine physiologische Insulinkonzentration zu einer subphysiologischen Antwort führt. Hinsichtlich des Kohlenhydratstoffwechsels bewirkt eine Insulinresistenz nicht nur eine ungenügende Glucoseverwertung im Muskel- und Fettgewebe, sondern trägt auch mit einer gesteigerten hepatischen Glucoseproduktion zur

Hyperglykämie bei (DeFronzo 1988). Aufgrund des Lebensstilwandels verbunden mit der Zunahme der Adipositas und Bewegungsmangel wird die Insulinresistenz als ursprüngliche pathogenetische Funktion anerkannt, obwohl diese Störung schon viele Jahre vorhanden ist, bevor ein Typ 2 Diabetes erstmals festgestellt wird. Deshalb war die von Reaven formulierte Hypothese des Metabolischen Syndroms erfolgreich, weil sie eine logische Erklärung für das Auftreten von kardiovaskulären Begleiterkrankungen des Typ 2 Diabetes bietet (Reaven 1988). Nach Reaven waren diese Spätkomplikationen auf eine gemeinsame Ursache, den Hyperinsulinismus zurückzuführen, die wiederum als Kompensation der Insulinresistenz aufzufassen ist, man spricht von einem Insulinresistenz-induzierten Hyperinsulinismus (Reaven 2005).

Der Typ 2 Diabetes ist aber nicht nur eine Krankheit der gestörten peripheren Insulinresistenz, sondern auch einer parallel gekoppelten Beta-Zelldysfunktion. Man nimmt an, dass beim Typ 2 Diabetes Beta-zelleigene intrinsische Defekte der Insulinsekretion und -produktion vorliegen, sodass eine dauerhafte Insulin-Hypersekretion zur Überwindung der Insulinresistenz nicht aufrechterhalten werden kann und es zu einem progredienten Versagen der Beta-Zellfunktion kommt (Palitzsch und Bollheimer 2000; (Kahn 1998). Eine verminderte Sekretionsfähigkeit des endokrinen Pankreas wird auch bei nichterkrankten normalgewichtigen erstgradig Verwandten von Typ 2 Diabetikern gefunden, sodass das Sekretionsdefizit nicht nur reaktiv sein kann (van Haeften 2002). Eines der frühesten Zeichen für den Übergang von gestörter Glucosetoleranz zu manifestem Typ 2 Diabetes ist die verminderte Ausprägung der ersten Phase der Insulinsekretion auf einem Glucosereiz, was in einer übermäßigen postprandialen Hyperglykämie resultiert (Del Prato 2003). Die unzureichende Insulinsekretion führt auch zu einer unzureichenden Unterdrückung der Glucagonsekretion während der Nahrungsaufnahme (Unger und Cherrington 2012).

Neben dem genetisch vererbten intrinsischen Beta-Zelldefekt sind im Zusammenhang mit Typ 2 Diabetes auch erworbene Defekte der Insulinsekretion als Konsequenz der Gluco- und Lipotoxizität von Bedeutung. Denn in Reaven's Konzept, das sich im Laufe der Jahre deutlich ausgeweitet hat, gilt der Hyperinsulinismus als die häufigste Ursache für die Manifestation des Metabolischen Syndroms (Reaven 2005). In diesem Szenario entsteht eine exogene Beta-Zellschädigung, die durch eine Glucotoxizität als Folge der Insulinresistenz und eine Lipotoxizität als Folge der Hyperinsulinämie verursacht wird. Die langandauernde

Hyperglykämie führt zunächst zu einer Überstimulation, dann zu einer funktionellen Desensibilisierung und schließlich als Glucotoxizität auch zur Beta-Zellapoptose (Rustenbeck 2002; Butler et al. 2003; Rahier et al. 2008). Und eine Exposition der Beta-Zellen mit hohen Konzentrationen an Fettsäuren (Hyperlipidämie) führt nach anfänglich vermehrter Insulinsekretion zu einer sukzessiven Abnahme der Insulinspeicher-Reserve der Beta-Zellen. Die Hyperlipidämie ist eine Folge des gestörten Fettstoffwechsels beim insulinresistenten (und in der Regel adipösen) Patienten mit Typ 2 Diabetes. So kann die daraus resultierende Lipotoxizität über verschiedene Mechanismen eine Apoptose induzieren und somit zu einem Beta-Zell Massenverlust führen. Zusätzlich werden auch endogene Faktoren für eine Beta-Zellschädigung verantwortlich gemacht, wie reaktive Sauerstoffspezies, die durch Hypersekretionsprozesse entstehen sowie ausgelöster Stress ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum (Lortz et al. 2005; Marchetti et al. 2007; Eizirik et al. 2008).

Ein weiterer pathogenetischer Faktor kann in einer Störung des Inkretineffekts bestehen. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen im Zusammenhang mit der chirurgischen Therapie der krankhaften Adipositas („bariatric surgery“) gestützt. Hierbei hat sich gezeigt, dass eine Ausschaltung bestimmter Darmabschnitte (Roux-y-Bypass) zu einer deutlichen Verbesserung der Stoffwechsellage führt, obwohl die Patienten zunächst noch stark übergewichtig sind (Rubino 2008; Ferrannini und Mingrone 2009). Insofern ist die Kopplung von Übergewicht, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes anscheinend lockerer als derzeit angenommen.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Pathogenese des Typ 2 Diabetes multifaktoriell ist. Denn genetische Defekte der Insulinwirkung (periphere Insulinresistenz) und der Insulinsekretion (Beta-Zelldysfunktion) tragen zur Hyperglykämie bei und werden durch diese und die gleichzeitig vorhandene Fettstoffwechselstörung (Gluko- und Lipotoxizität) verstärkt und kumulieren in Kombination mit Adipositas und Bewegungsmangel in der Entstehung eines manifesten Typ 2 Diabetes. Für die Wahl der Therapiemodalität sollte die im Einzelfall vorherrschende pathophysiologische Störung berücksichtigt werden (Spinass und Lehmann 2001).

### 1.3 Die physiologische Regulation der Insulinsekretion

Der Entstehungs- und zugleich Sekretionsort des Peptidhormons Insulin sind die pankreatischen Beta-Zellen. Beta-Zellen liegen zentral in einem inselartigen Zellverband, den Langerhans'schen Inseln, die im Pankreas in großer Anzahl verstreut im exokrinen Gewebe eingebettet sind. Diese kleinen Mikro-Organen mit einem Durchmesser von 75-300  $\mu\text{m}$  besitzen vier verschiedene endokrine Zelltypen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen sowie mit unterschiedlicher Funktionalität. Es sind 80%  $\beta$ -Zellen und 15% Glucagon-sezernierende  $\alpha$ -Zellen, nur wenige Zellen produzieren Somatostatin ( $\delta$ -Zellen) oder das pankreatische Polypeptid (PP-Zellen) (St-Onge und Wagner 2006; Lang und Lang 2007).

Der für die Beta-Zellen wichtigste physiologische Stimulus zur Ausschüttung des Insulins ist eine Erhöhung der Blutglucosekonzentration. Die physiologische Regulation der Insulinsekretion in den Beta-Zellen ist in den Grundzügen mittlerweile gut verstanden. Eine Zunahme der Blutglucosekonzentration, wie sie postprandial entsteht, führt zu einer erhöhten Glucoseaufnahme mittels des membranständigen, niedrigaffinen GLUT2-Transporter (bei Menschen GLUT1) in das Cytosol der Beta-Zelle (Schuit et al. 2001). Es folgt die Metabolisierung von Glucose mit anschließender Aktivierung des Energiestoffwechsels der Beta-Zelle (Coore und Randle 1964; Malaisse 1983; Matschinsky 1996). Der erste Metabolisierungsschritt in der Glykolyse, der durch die Glucokinase katalysiert wird, ist geschwindigkeitsbestimmend (Lenzen und Panten 1988). Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird in den Matrixraum der Mitochondrien transportiert, zu Acetyl-CoA umgesetzt und im Citratzyklus zu Kohlenstoffdioxid metabolisiert. Im Citratzyklus werden Nukleotide NAD und FAD zu NADH und  $\text{FADH}_2$  reduziert und sind am Aufbau eines Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran beteiligt (Mitchell und Moyle 1967). Dieser Gradient stellt die Voraussetzung für die darauffolgende oxidative Phosphorylierung dar. Bei diesem Prozess wird der aufgebaute Protonengradient durch das Enzym ATP-Synthase zur ATP-Bildung bei gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff und Wasser verwendet. Dadurch steigt die metabolisch erzeugte ATP-Konzentration und gleichzeitig fällt die  $\text{MgADP}$ -Konzentration (Meglasson und Matschinsky 1986; Detimary et al. 1995).

Die Exozytose von Insulin-Granula wird durch eine Zunahme der cytosolischen Calciumkonzentration ausgelöst, die im Falle einer Glucose-induzierten Insulinsekretion fast vollständig aus einem Calcium-Einstrom durch membranständige, spannungsabhängige



Calciumkanäle resultiert (Hellman et al. 1980; Rorsman et al. 1988). Ihre Öffnung wird durch ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanal) kontrolliert, die für die Verknüpfung vom Zellstoffwechsel mit dem Membranpotential eine Schlüsselrolle in der Insulinsekretion spielen. Bei einem niedrigen Blutzuckerspiegel befinden sich die  $K_{ATP}$ -Kanäle im geöffneten Zustand. Der daraus resultierende Kaliumausstrom bewirkt ein Ruhemembranpotential von ca. -70 mV und verhindert somit eine elektrische Aktivität, die mit einer Calcium-Kanal Öffnung, Calcium-Einstrom und letztendlich Insulinsekretion einhergehen würde. Eine erhöhte ATP-Konzentration erhöht die Wahrscheinlichkeit membranständige  $K_{ATP}$ -Kanäle zu schließen (Cook und Hales 1984; Ashcroft und Rorsman 1989). Der  $K_{ATP}$ -Kanal besteht aus 2 Untereinheiten: der porenformenden Einheit  $K_{ir}6.2$  und der regulatorischen Einheit, dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor SUR1 (Inagaki et al. 1995). Beide Untereinheiten liegen jeweils in einer 4:4-Stöchiometrie vor und bilden somit einen oktamerischen Komplex. Aus physiologischer Sicht verbleibt der  $K_{ATP}$ -Kanal durch Bindung von MgADP an SUR1 im geöffneten Zustand und ATP führt zum  $K_{ATP}$ -Kanalschluss durch Bindung an  $K_{ir}6.2$  (Ashcroft und Gribble 1999). Wird nun nach erhöhter Glucose-Metabolisierung der  $K_{ATP}$ -Kanal durch ATP geschlossen, depolarisiert die Beta-Zellmembran auf ca. -40 mV aufgrund des verringerten Kaliumausstroms. Eine Depolarisation in einer Beta-Zelle durch eine stimulatorische Glucosekonzentration zeigt oszillierendes Verhalten (Henquin und Meissner 1984). Nach Erreichen eines Schwellenwerts (ca. -40 mV) werden Aktionspotentiale ausgelöst, die einen Calciumeinstrom repräsentieren. Die durch die Depolarisation der Plasmamembran ausgelöste Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Henquin und Meissner 1984) führt zum Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration, welches das unabdingbare Signal für die Initiation der Insulinsekretion darstellt. Dieser  $K_{ATP}$ -Kanal-abhängige Mechanismus wird als „triggering pathway“ bezeichnet. Auch Arzneimittel, wie Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid), stimulieren ebenfalls durch einen Schluss der  $K_{ATP}$ -Kanäle eine Insulinsekretion. Sie binden an die regulatorische Untereinheit SUR (= sulphonylurea receptor) und können den Kanal schließen, ohne dass ein Anstieg der ATP-Konzentration erfolgt (Sturgess et al. 1985). Diese Medikamente werden seit fast 60 Jahren verwendet, um den Typ 2 Diabetes zu behandeln (Henquin 1992).

Des Weiteren hat der Metabolismus von Glucose noch zusätzlich verstärkende Auswirkungen auf die Insulinsekretion, die unabhängig von dem Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals und daraus resultierenden Calciumeinstrom sind. Erkannt wurde dieser Signalweg dadurch, dass

eine stimulatorische Glucosekonzentration die Insulinsekretion noch weiter steigern kann als ein vollständiger  $K_{ATP}$ -Kanalschluss durch einen Sulfonylharnstoff es vermag (Panten et al. 1988). Dieser verstärkende Signalweg ist also  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängig und heißt nach einem Vorschlag von Henquin „amplifying pathway“ (Henquin 2000). Die Signalkaskade wird noch nicht vollständig verstanden, aber das Endergebnis ist eine Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit der sekretorischen Insulin-Granula, ohne dass die cytosolische Calciumkonzentration sich ändert (Ravier et al. 2010). Außer Glucose sind noch einige Aminosäuren in der Lage, die Insulinsekretion zu steigern, so z.B. Leucin und die Kombination aus Leucin und Glutamin. Auch einige Ketosäuren steigern die Insulinsekretion als sog. „fuel secretagogues“ (Panten et al. 1972; Malaisse et al. 1981), dies ist aber für die physiologische Regulation wenig bedeutsam. Hormone und Neurotransmitter können die Insulinsekretion modulieren, d.h. sie lösen die Sekretion nicht aus, sind aber in der Lage diese zu verstärken oder zu hemmen.

Aktuell ist das Interesse auf Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1) fokussiert, das von Darm-L-Zellen freigesetzt wird in Reaktion auf eine Anwesenheit von Glucose und andere Nährstoffe im Darmlumen. Es stimuliert die Produktion von cAMP in der Beta-Zelle, welches durch PKA-abhängige und PKA-unabhängige Mechanismen auf die Exozytose der Insulin-Granula ebenfalls amplifizierend wirkt, wobei Steigerung des  $K_{ATP}$ -Kanal-Schlusses mit vermehrter elektrischer Aktivität in der Beta-Zellmembran und Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern beteiligt sein könnten (Leech et al. 2011). Die meisten dieser Effekte manifestieren sich nur bei erhöhtem Blutzuckerspiegel und tragen somit für die Glucose-abhängige durch GLP-1-potenzierte Insulinsekretion bei. Die Ausschüttung der Inkretinhormone im Darm erklärt, warum eine orale Glucose-Applikation für eine deutlich größere Stimulation der Insulinsekretion sorgt als eine intravenöse Glucose-Applikation.

Die PKA-unabhängigen Effekte der Inkretine werden durch das cAMP-sensitive Protein Epac2 vermittelt. Kürzlich wurde auch gezeigt, dass Epac2 (exchange protein directly activated by cAMP 2) ein Wirkort der Sulfonylharnstoffe ist (Zhang et al. 2009). Es bleibt noch offen, ob diese Wirkung in therapeutischen Konzentrationen zustande kommt. Zudem gibt es Hinweise, dass Sulfonylharnstoffe direkt den Exozytose-Prozess in Beta-Zellen verstärken (Eliasson et al. 2003). Ebenso erhöht die Aktivierung von PKA oder PKC (z.B. in Reaktion auf Acetylcholin  $mACh$ -Rezeptoren) die  $Ca^{2+}$ -abhängige Exozytose („neurohormonal

amplification“) ohne weiteren Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration. Andere Liganden, wie Adrenalin (über  $\alpha_2$ -Rezeptoren) und Somatostatin, inhibieren die Glucose-induzierte Insulinsekretion, auch wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht ist - möglicherweise durch die Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin (Rorsman und Renstrom 2003).

Die Insulinsekretion von isolierten Inseln erfolgt in einem biphasischen Muster (Curry et al. 1968). Auf einen ersten schnellen transienten Peak folgt eine sich langsam entwickelnde zweite Freisetzungs-Phase bis sich die Blutglucosekonzentration wieder normalisiert. Bei andauernd erhöhter Glucosekonzentration erfolgt eine Desensibilisierung, d.h. es ist nur noch eine Insulinsekretion auf niedrigem Level registrierbar. Diese 3. Phase wird auch als Desensibilisierungsphase der Insulinsekretion bezeichnet (Grodsky 1989). Es wurde vorgeschlagen, dass die Natur der zweiphasigen Insulinsekretion die Existenz von verschiedenen funktionellen Pools von Sekretgranula innerhalb der Beta-Zellen widerspiegelt. Eine Untergruppe aus sekretionsbereiten Insulin-Granula, als „readily-releasable pool“ bezeichnet (in Analogie zu Nervenendigungen), der sich in der Nähe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen befindet, soll den Speicher für die erste Phase der Insulinsekretion bilden (Bokvist et al. 1995). Sobald dieser Pool aufgebraucht ist, werden Granula aus dem Zellinneren mobilisiert, der „reserve pool“, die (abhängig vom Energiestoffwechsel) an die Innenseite der Zellmembran wandern und so die zweite Freisetzungs-Phase bilden. Die verminderte Anzahl an sekretionsbereiten Granula an der Plasmamembran-Innenseite wäre dann die Ursache des Abfalls der Sekretionsrate bei gleichbleibendem Stimulus. Wie bei einer Neurotransmitter-Ausschüttung benötigt die Exozytose von Insulin-Granula die SNARE-Proteine Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP25 (Gerber und Südhof 2002; Rorsman und Renstrom 2003). Es wird angenommen, dass Metabolite aus dem Glucose-Stoffwechsel einen Einfluss auf den Beta-Zell-SNARE-Komplex haben, somit in die Exozytose-Maschinerie eingreifen und eine verstärkende Wirkung auf die Insulinsekretion ausüben.

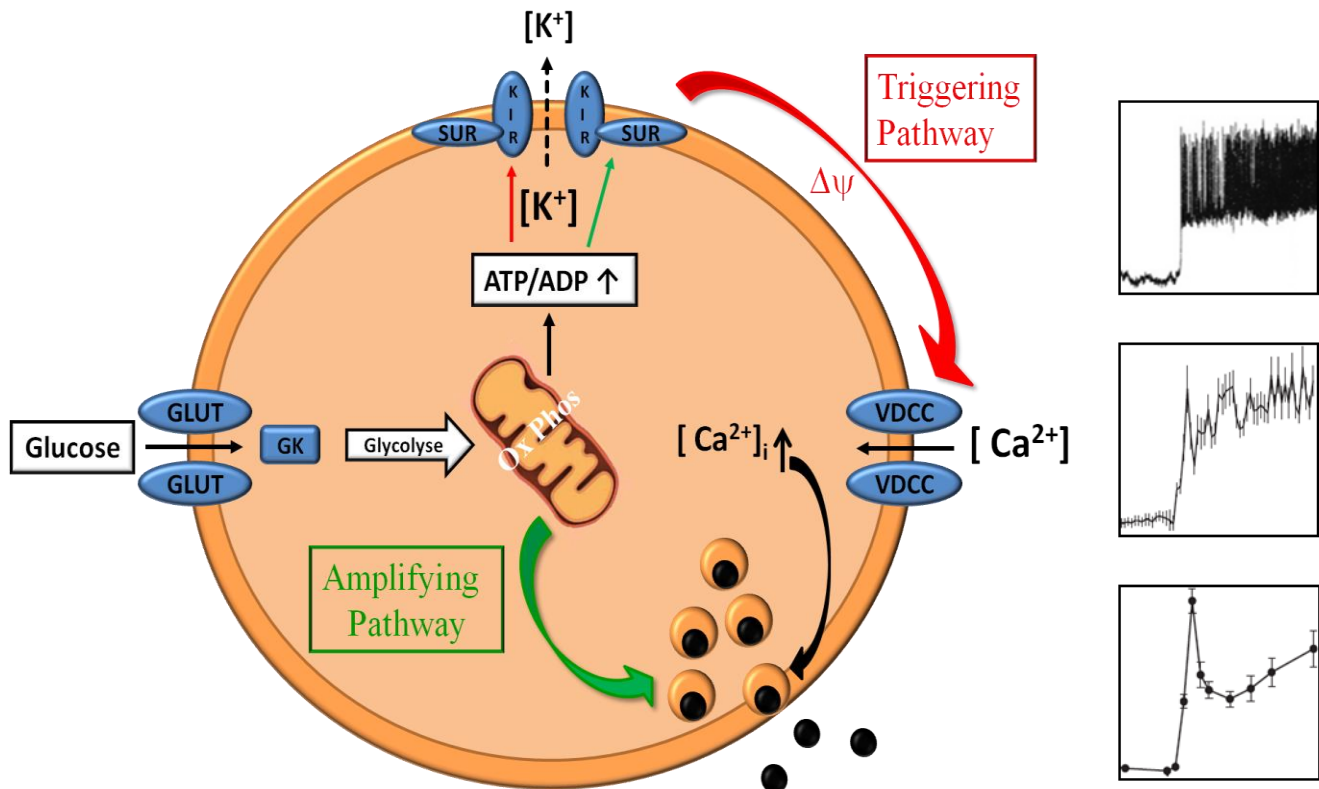


Abbildung 1.1 Schema der Stimulus-Sekretions-Kopplung in der pankreatischen Beta-Zelle

Nach der Aufnahme von Glucose mittels einem GLUT2-Transporter erfolgt die Metabolisierung von Glucose mit anschließender Aktivierung des Energiestoffwechsels der Beta-Zelle. Der erste Metabolisierungsschritt in der Glykolyse wird durch die Glucokinase (GK) katalysiert. Die Aktivierung des Citratzyklus in den Mitochondrien reduziert NAD und FAD, dadurch steigt die oxidative Phosphorylierung (Ox Phos) und führt zum Anstieg des cytosolischen ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisses. Dieser Anstieg bewirkt einen Schluss der K<sub>ATP</sub>-Kanäle (bestehend aus 2 Untereinheiten: K<sub>ir</sub>6.2 und Sulfonylharnstoff-Rezeptor SUR1) mit anschließender Depolarisation (Δψ) der Plasmamembran. Die Depolarisation öffnet spannungsabhängige Calcium-Kanäle (VDCC), was einen vermehrten Einstrom von Ca<sup>2+</sup> in das Cytosol zur Folge hat. Der Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induziert die Insulinsekretion (triggering pathway), die durch unbekannte Signalstoffe aus dem mitochondrialen Stoffwechsel verstärkt wird (amplifying pathway).

## 2 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Depolarisation der Plasmamembran in den Beta-Zellen des Pankreas ist derzeit allgemein als unabdingbare Voraussetzung für die stimulierte Insulinsekretion anerkannt. Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige Calciumkanäle in der Plasmamembran der insulinsezernierenden Beta-Zellen geöffnet und der resultierende Calciumeinstrom durch diese Kanäle setzt die Exozytose des granulär gespeicherten Insulins in Gang. Eine Vielzahl von experimentellen Verfahren, die die Mechanismen der Signaltransduktion in den Beta-Zellen weiter aufklären oder auch die Wirkung von insulinsekretionssteigernden Pharmaka erfassen sollen, beinhalten die pharmakologische Depolarisation der Plasmamembran. Diese wird entweder durch den Schluss der ATP-abhängigen Kaliumkanäle oder durch eine hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration (typischerweise 30 bis 40 mM  $K^+$ ) bewirkt. Bisher konnte nicht detailliert geklärt werden, ob beide Verfahren gleichwertig sind. So treten nur bei der Blockade von  $K_{ATP}$ -Kanälen Aktionspotentiale auf, die für die Glucose-induzierte Sekretion typisch sind. Zudem hatte sich in den bisherigen Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine Depolarisation durch 15 mM Kaliumchlorid, die ungefähr halbmaximal effektiv hinsichtlich des Membranpotentials ist, nur eine minimale Sekretionssteigerung bewirken konnte. Es ergaben sich somit folgende Fragen:

1. Warum führt 40 mM KCl, nicht aber 15 mM KCl zu einer starken Insulinsekretionssteigerung?
2. Welche Transportmechanismen bewirken den  $Ca^{2+}$ -Einstrom bei einer durch 15 mM KCl induzierten Depolarisation und welche (zusätzlichen) bei 40 mM KCl?
3. Wie unterscheidet sich der durch  $K_{ATP}$ -Kanalblockade ausgelöste Calciumeinstrom von dem durch 15 bzw. 40 mM KCl ausgelöstem Calciumeinstrom?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden an primären Beta-Zellen Messungen des Plasmamembranpotentials als regulierende Größe der spannungsabhängigen Calciumkanäle durchgeführt sowie an frisch isolierten Pankreasinseln der Maus Messungen der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  und des cytosolischen pH-Wertes  $[pH]_i$ .

### 3 Material und Methoden

Die eingesetzten Methoden sind überwiegend in der Arbeitsgruppe etabliert.

#### 3.1 Isolierung der Pankreasinseln, Einzelzellgewinnung aus NRMI-Mäusen und deren Kultivierung

##### 3.1.1 Verwendete Lösungen

###### 3.1.1.1 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer

Als Basismedium für die Isolierung der Langerhans'schen Inseln diente ein modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer, der im weiteren Verlauf als Krebs-Ringer-Lösung bezeichnet wird. Im Puffer wurde zur Stabilisierung des pH-Wertes von 7,4 ein Teil des Bicarbonats durch einen nichtflüchtigen organischen HEPES-Puffer ersetzt, weil die Krebs-Ringer-Lösung durch das Entweichen von Kohlenstoffdioxid alkalisch werden würde (Lernmark 1974).

Für ein Endvolumen von 2 Litern Krebs-Ringer-Lösung wurden

Einwaage	Substanz	Molarität
13,441 g	NaCl (Fa. AppliChem, Darmstadt, $M_r = 58,44 \text{ g/mol}$ )	115 mM
4,766 g	HEPES (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 238,31 \text{ g/mol}$ )	10 mM
3,360 g	NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 84,01 \text{ g/mol}$ )	20 mM
1,982 g	D-Glucose x H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 198,17 \text{ g/mol}$ )	5 mM
752,74 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 147,02 \text{ g/mol}$ )	2,56 mM
700,77 mg	KCl (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 74,56 \text{ g/mol}$ )	4,7 mM
591,55 mg	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 246,48 \text{ g/mol}$ )	1,2 mM
326,26 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 136,09 \text{ g/mol}$ )	1,2 mM
2,000 g	Albumin (Fa. Serva, Heidelberg, $M_r = \text{ca. } 67000 \text{ Da}$ )	0,1% (m/V)

eingewogen, in Aqua bidest. gelöst und mit 1N NaOH ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dieser Gesamtansatz wurde steril gefiltert (Sartolab P20 Plus, Oberflächenfreies Celluloseacetatfilter, Glasfaserfilter Porengröße 0,20  $\mu\text{m}$ , Sartorius), in autoklavierte 100 ml Einzelgefäße portioniert und diese bei 2°C bis 8°C gelagert.

### 3.1.1.2 Calciumfreie Lösung zur Gewinnung von Einzelzellen aus Langerhans'schen Inseln

Für 100 ml calciumfreie Lösung wurden

Einwaage	Substanz	Molarität
788,94 g	NaCl (Fa. AppliChem, Darmstadt, $M_r = 58,44$ g/mol)	135 mM
595,78 g	HEPES (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 238,31$ g/mol)	25 mM
59,45 g	D-Glucose x $H_2O$ (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 198,17$ g/mol)	3 mM
35,78 mg	KCl (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 74,56$ g/mol)	4,8 mM
29,58 mg	$MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 246,48$ g/mol)	1,2 mM
19,02 mg	EGTA (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, $M_r = 380,40$ g/mol)	0,5 mM
16,33 mg	$KH_2PO_4$ (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 136,09$ g/mol)	1,2 mM
1,000 g	Albumin (Fa. Serva, Heidelberg, $M_r = \text{ca. } 67000$ Da)	0,1% (m/V)

eingewogen, in Aqua bidest. gelöst und mit 1N NaOH ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Dieser Gesamtansatz wurde steril gefiltert (Filtropur S plus 0,2  $\mu$ M, Celluloseacetatfilter und Glasfaser-Vorfilter, Sarstedt, Nümbrecht), in Einzelvolumina zu je 5 ml in Plastikröhrchen portioniert und diese bei 2°C bis 8°C gelagert.

### 3.1.2 Kulturmedien für die Zellkultur

#### 3.1.2.1 RPMI 1640 mit 10 mM Glucose (Vorinkubation)

Für die ersten 2,5 bis 3 Stunden der Zellkultur von isolierten Langerhans'schen Inseln sowie Einzelzellen wurde ein RPMI 1640-Medium mit einer Glucosekonzentration von 10 mM verwendet, weil bei dieser Glucosekonzentration ein stärkeres, adhärentes Anwachsen der Pankreasinseln sowie Einzelzellen auf dem Boden der Zellkulturschale (Nunc™ Surface, Nunc) beobachtet wurde.

Für 500 ml RPMI 1640 mit 10 mM Glucose wurden

Einwaage	Substanz
5,220 g	RPMI 1640 (Fa. Seromed, Berlin, Cat No. T 121 – 10, w L-Glutamine, w/o $NaHCO_3$ )
1,000 g	$NaHCO_3$ (Fa. Merck (Darmstadt), $M_r = 84,01$ g/mol)

eingewogen und in 450 ml Aqua. bidest gelöst.

Penicillin und Streptomycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 IU/ml (Biochrom AG) und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Biochrom AG) auf ein Volumen von 500 ml bezogen ergänzt.

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde der Ansatz steril filtriert (Sartolab P20 Plus, Oberflächenfreies Celluloseacetatfilter, Glasfaserfilter Porengröße 0,20 µM, Sartorius), in Einzelportionen zu 45 ml abgefüllt und bei 2°C bis 8°C gelagert. Vor Gebrauch wurde den Einzelportionen 5 ml fötales Kälberserum (Foetal Bovine Serum, FBS; Synonym: FCS; PAA Laboratories, Pasching) zugegeben, sodass 50 ml RPMI-Medium demnach 10% FCS enthielten.

### **3.1.2.2 RPMI 1640 mit 5 mM Glucose (Hauptinkubation)**

2,5 bis 3 Stunden nach der Gewinnung der Pankreasinseln sowie Einzelzellen begann die eigentliche Kultivierung. Hierbei wurde ein RPMI 1640-Medium mit einer Glucosekonzentration von 5 mM verwendet, die keine Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln sowie pankreatischer Beta-Einzelzellen der Maus auslöst.

Für 1 l RPMI 1640 mit 5 mM Glucose wurden

Einwaage	Substanz
8,440 g	RPMI 1640 (Gibco BRL, WIE 074-01800, w L-Glutamine, w/o D-Glucose, w/o NaHCO <sub>3</sub> )
0,991 g	D-Glucose-Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt, M <sub>r</sub> = 198,17 g/mol)
2,000 g	NaHCO <sub>3</sub> (Fa. Merck, Darmstadt, M <sub>r</sub> = 84,01 g/mol)

eingewogen und in 900 ml Aqua. bidest gelöst.

Penicillin und Streptomycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 IU/ml (Biochrom AG) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG) auf ein Volumen von 1 l bezogen ergänzt.

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde der Ansatz steril filtriert (Sartolab P20 Plus, Oberflächenfreies Celluloseacetatfilter, Glasfaserfilter Porengröße 0,20 µM, Sartorius), in Einzelportionen zu 90 ml abgefüllt und bei 2°C bis 8°C gelagert. Vor Gebrauch wurde den Einzelportionen 10 ml FCS zugegeben, sodass 100 ml RPMI-Medium demnach 10% FCS enthielten.

### **3.1.2.3 Kollagenlösung zur Beschichtung von Deckgläsern**

Zur Kultivierung von Pankreasinseln auf Deckgläsern (d = 25 mm; Stärke 0,13 bis 0,17 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) wurden diese mit Kollagen beschichtet. Zur Herstellung von 2 ml Kollagenlösung wurden 1 mg Kollagen vom Typ 1 (C7661; Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis) durch eine steril filtrierte (Filtropur S plus 0,2 µM, Celluloseacetatfilter und Glasfaser-Vorfilter,



Sarstedt, Nümbrecht) 0,2%-igen Essigsäure in Lösung gebracht. Anschließend wurde das Kollagen in einem 37°C temperierten Schüttelbad vollständig gelöst. Die Kollagenlösung stand für ca. 4 Wochen bei einer Lagertemperatur von 4°C zur Verfügung.

### **3.1.3 Isolierung der Langerhans'schen Inseln aus NMRI-Mäusen**

Die Isolierung der Langerhans'schen Inseln durch eine Kollagenase-haltigen Injektionslösung in den Gallengang (Ductus choledochus) wurde nach Gotoh praktiziert um eine höhere Ausbeute an Inseln pro Pankreaspräparation zu erzielen (Gotoh et al. 1985). Dabei wurde eine in der institutseigenen Tierhaltung gezüchtete NMRI-Maus (12-14 Wochen alt) dekapitiert, das Fell im Abdominalbereich mit Ethanol desinfiziert und anschließend das Abdomen großräumig geöffnet. Nach Auffinden des Pankreasganges (Ductus pancreaticus) wurde dieser an der Einmündung in das Duodenum, Papilla Vateri, abgeklemmt. Danach wurde der Gallengang aufgesucht und in diesem unter dem Mikroskop langsam 3 ml Kollagenase-Lösung (Collagenase, SERVA, Göttingen, 1mg Collagenase/ 1ml Krebs-Ringer-Lösung) mittels einer sterilen 2 ml Plastikspritze (Injekt®, Braun) mit aufgesetzter, sterilen Kanüle (Sterican®, 0,30 x 12 mm, 30GA ½) injiziert, sodass die Lösung retrograd durch den Pankreasgang fließt und eine komplette Füllung des Pankreas bewirkte. Mit dem Lösen der Klemme begann unter Verwendung von sterilisierten Pinzetten die akribische und zügige Entfernung des Pankreas, welches in einem Gefäß gesammelt und auf Eis gestellt wurde. In einem 37°C warmen Wasserbad wurde das Pankreas für ca. 10 Minuten enzymatisch durch die Kollagenase aufgespalten, wobei in der letzten Minute zusätzlich per Hand im Wasserbad geschüttelt wurde. Der Kollagenase-Prozess wurde durch Zugabe von 10 ml kalter Krebs-Ringer-Lösung gestoppt und bei 300 x g für 15 s zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus). Der Überstand wurde abgegossen und das Prozedere einmal wiederholt. Das Gefäß wurde erneut mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllt und der Inhalt anschließend in eine schwarze Glas-Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) und der Beleuchtung durch Kaltlichtquellen (KL 1500, Schott) wurden die frisch gewonnenen Langerhans'schen Inseln mit einer Eppendorf-Pipette aus dem angedautem exokrinen Pankreas der Maus herauspipettiert und in einer anderen auf Eis stehenden mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllten Glas-Petrischale gesammelt. Die isolierten Langerhans'schen Inseln wurden einmal nach 3.1.3.1 für Patch-Clamp-Versuche zur Gewinnung von Einzelzellen weiterverarbeitet oder nach 3.1.3.2 für mikrofluorimetrischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen und cytosolische pH-Wert-Messung kultiviert und verwendet.

### **3.1.3.1 Einzelzellgewinnung für Patch-Clamp-Versuche**

Die aus 3.1.3 isolierten Pankreasinseln wurden in einem schwarzen, konischen Plastikgefäß überführt und soweit wie möglich von Krebs-Ringer-Lösung befreit, sodass die gesammelten Pankreasinseln komplett mit einem Pipettenzug in das mit der calciumfreien Lösung enthaltende Plastikgefäß (siehe 3.1.1.2) gegeben werden konnten (Lernmark 1974), um das Aufbrechen des Zellverbandes in Einzelzellen einzuleiten. Die Inkubationszeit von 10 Minuten für diesen Ansatz begann und endete jeweils mit einem einminütigen Vortex-Prozess (MS2 Minishaker, IKA®) bei ca. 2000 U/min. Im Anschluss wurde die Zellsuspension eine Minute bei 20°C und 1000 U/min zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus). Unter der Sterilwerkbank wurde die calciumfreie Lösung soweit wie möglich abgesaugt und durch 5 ml RPMI 1640 mit 10 mM Glucose und FCS (10% (v/v)) (3.1.2.1) kompensiert. Nach dem Vortexen für 20 s wurde wie oben angegeben erneut zentrifugiert. Danach wurde das RPMI-Medium abgesaugt und durch so viel frisches ergänzt, sodass es für alle vorbereiteten Zellkulturschalen (d = 35 mm, Nunclon™ Surface, Nunc) ausreicht, d.h. pro Zellkulturschale wurden 30 µl RPMI-Medium mit 10 mM Glucose eingeplant. Es wurde für Zellen aus 10 isolierten Inseln jeweils eine Zellkulturschale vorbereitet. Daraufhin wurde mit Hilfe einer Eppendorfpipette das RPMI-Medium mehrmals hoch und runter gesaugt um verbliebende Zellaggregate zu lösen. Mit dieser Pipette wurde die Zellsuspension auf den markierten Mittelpunkt der Zellkulturschale zu Anteilen von ca. 30 µl aufgeteilt. Die gewonnenen Zellen wurden zwei bis drei Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (hält den entsprechenden pH-Wert des Mediums konstant) und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Begasungsbrutschrank (SANYO CO<sub>2</sub>-Incubator, Model: MCO-18AIC (UV)) inkubiert, damit möglichst viele Zellen am Boden der Zellkulturschale adhärent anwachsen. Nach der Inkubationszeit wurde pro Zellkulturschale 2,5 ml RPMI 1640 mit 5 mM Glucose und FCS (10% (v/v)) zugegeben und die Zellkultur fortgesetzt.

### **3.1.3.2 Kultivierung isolierter Mausinseln für mikrofluorimetrische Ca<sup>2+</sup>-Messungen sowie für cytosolische pH-Wert-Messungen**

Zur Bestimmung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sowie des cytosolischen pH-Wertes wurden die aus 3.2 isolierten Pankreasinseln auf hitzesterilisierten Deckgläsern kultiviert. Da die Deckgläser als Träger der Pankreasinseln für die Perfusionen dienten, wurden diese mit einer Kollagenlösung (3.1.2.3) beschichtet um das Anwachsen der Pankreasinseln zu fördern. Die Beschichtung wurde unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Dabei wurde ein

Deckglas pro Zellkulturschale mittig positioniert, auf dieses ca. 2  $\mu$ l Kollagenlösung und ca. 0,5  $\mu$ l RPMI 1640 mit 10 mM Glucose gegeben (3.1.2.1), wobei eine vorher markierte Fläche in der Mitte der Zellkulturschale mit einer Pipettenspitze gleichmäßig bis zur Trockenheit ausgestrichen wurde (Lenzen und Peckmann 2001). Die Langerhans'schen Inseln wurden vor der Transferierung auf die vorbereiteten Deckgläsern zweimal in RPMI 1640 mit 10 mM Glucose und fötalem Kälberserum (10% (v/v)) gewaschen. Dann wurden drei bis vier Pankreasinseln in einem Volumen von 40  $\mu$ l RPMI-Nährmedium (mit 10 mM Glucose) auf je ein beschichtetes Deckglas transferiert. Die Pankreasinseln wurden für ca. drei Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank (SANYO CO<sub>2</sub>-Incubator, Model: MCO-18AIC (UV)) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde unter sterilen Bedingungen in jeder Zellkulturschale 2,5 ml RPMI 1640 mit 5 mM Glucose und fötalem Kälberserum (10% (v/v)) ergänzt und die Zellkultur fortgesetzt. Nach 48 h Kultivierungsdauer waren die Pankreasinseln auf den beschichteten Deckgläsern angewachsen und somit für die geplanten Umströmungen verwendbar.

## 3.2 Patch-Clamp-Versuche

### 3.2.1 Verwendete Lösungen und Materialien

#### 3.2.1.1 Extrazelluläre-Lösung (EZ) mit 5 mM Glucose:

Für ein Endvolumen von 2 Litern EZ wurden

Einwaage	Substanz	Molarität
16,36 g	NaCl (Fa. AppliChem, Darmstadt, $M_r = 58,44$ g/mol)	140 mM
834,96 mg	KCl (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 74,56$ g/mol)	5,6 mM
487,92 mg	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 203,30$ g/mol)	1,2 mM
764,50 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 147,02$ g/mol)	2,6 mM
4,766 g	HEPES (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 238,31$ g/mol)	10 mM
1,982 g	D-Glucose x H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 198,17$ g/mol)	5 mM

eingewogen, in Aqua bidest. gelöst und mit 1N NaOH ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die EZ mit 5 mM Glucose wurde für Patch-Clamp-Messungen in der whole-cell Konfiguration sowie perforated-patch Konfiguration verwendet.

#### 3.2.1.2 Pipettenlösung für die whole-cell Konfiguration

Für ein Endvolumen von 100 ml wurden

Einwaage	Substanz	Molarität
1043,70 mg	KCl (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 74,56$ g/mol)	140 mM
380,40 mg	EGTA (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, $M_r = 380,40$ g/mol)	10 mM
119,16 mg	HEPES (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 238,31$ g/mol)	5 mM
29,40 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 147,02$ g/mol)	2 mM
20,33 mg	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 203,30$ g/mol)	1 mM

eingewogen, in Aqua bidest. gelöst und mit 1N KOH ein pH-Wert von 7,15 eingestellt.

Für die whole-cell Konfiguration (3.2.3.3) ist eine Abwesenheit von Calcium in der Pipettenlösung erforderlich, damit sich der Membranfleck nicht wieder schließt. Darum beinhaltet die Pipettenlösung als zweiwertige Ionen Magnesium und einen sensitiven Calcium-Komplexbildner EGTA.

### 3.2.1.3 Pipettenlösung für die perforated-patch Konfiguration

Für ein Endvolumen von 100 ml wurden nach Smith et al. (Smith et al. 1990):

Einwaage	Substanz	Molarität
<b>1,22 g</b>	<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> (Fa. Roth, Karlsruhe, M <sub>r</sub> = 174,30 g/mol)	140 mM
<b>142,31 mg</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</b> (Fa. Merck, Darmstadt, M <sub>r</sub> = 203,30 g/mol)	7 mM
<b>119,16 mg</b>	<b>HEPES</b> (Fa. Roth, Karlsruhe, M <sub>r</sub> = 238,31 g/mol)	5 mM
<b>74,55 mg</b>	<b>KCl</b> (Fa. Roth, Karlsruhe, M <sub>r</sub> = 74,56 g/mol)	10 mM
<b>58,44 mg</b>	<b>NaCl</b> (Fa. AppliChem, Darmstadt, M <sub>r</sub> = 58,44 g/mol)	10 mM

eingewogen, in Aqua bidest. gelöst und mit 1N KOH ein pH-Wert von 7,35 eingestellt.

Für die Nystatin-haltige Pipetten-Lösung wurden

**5 mg Nystatin-Dihydrat** (Fa. Biochemika, Düsseldorf, M<sub>r</sub> = 962,10 g/mol) in 1 ml DMSO (Fa. Merck, Darmstadt, p.a.) gelöst.

Diese Stammlösung wurde täglich frisch hergestellt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Von dieser Nystatin-Stammlösung wurden 45 µl entnommen und bis zu 2 ml mit perforated-patch Pipettenlösung aufgefüllt. Die entstandene Nystatin-haltige Pipetten-Lösung wurde in eine 2 ml Plastikspritze (Injekt®, Braun) überführt. Auf dem Luer-Konus wurde ein Sterilfilter (Filtropur S plus 0,2 µm) und auf diesen ein schmaler Kunststoffschlauch gesteckt. Der transparente Zylinder der Spritze wurde mit Aluminiumpapier als Lichtschutz umhüllt und während des gesamten Versuchstages in einer geschlossenen, mit Eis gefüllten Styroporbox gelagert und verwendet.

### 3.2.1.4 Patch-Pipetten

Die Patch-Pipetten für elektrophysiologische Untersuchungen wurden aus mittelharterm Borosilikatglaskapillaren hergestellt, die aus Glasmeterware mit einem Diamantschneider auf eine Länge von 7,5 cm zugeschnitten wurden. Die Schnittkanten wurden durch Erwärmung über einer rauschenden Bunsenbrennerflamme abgerundet, einerseits um eine bestehende Verletzungsgefahr zu vermeiden und andererseits damit die Patch-Pipetten beim Einsetzen in den Pipettenhalter die Silberchloridschicht der Messelektrode so wenig wie möglich beschädigen. Um Pipettenöffnungen mit einem Durchmesser von 1 bis 2 µm herzustellen, wurden die zurechtgeschnittenen Kapillaren mit einem vertikalem Pipettenziehgerät (Patch-Pipette Puller, PA-10, E.S.F.), in einem zweiphasigen Ziehvorgang zu

zwei Patch-Pipetten mit identischen Dimensionen ausgezogen. Dazu wurden die Kapillaren so in die Halterung des Vertikalpullers eingespannt, dass sich ihre Mitte im Zentrum eines zur Spirale gedrehten Heizfilamentdrahts befand. Durch Induktion eines Stroms auf diesen Draht erwärmt sich dieser, sodass sich die Ziehvorgänge steuern ließen. Dabei war der erste Ziehvorgang für die Verjüngung der Pipettenspitze verantwortlich und der zweite bestimmte den Durchmesser der Pipettenspitze. Je höher die Temperatur, durch größere Stromzufuhr, der Heizspirale gewählt wurde, umso steiler war die Verjüngung der Pipettenspitze durch den ersten Ziehvorgang und umso kleiner war der Durchmesser der Pipettenspitze im zweiten Ziehvorgang. Ein kleiner Pipettendurchmesser verursacht einen hohen Widerstand der mit Elektrolyt-Lösung gefüllten Pipette, wenn diese in die Badlösung eintaucht. Ein geeigneter Widerstand sollte zwischen 3 und 7 Megaohm liegen. Um höhere Abdichtwiderstände zwischen Pipette und Zellmembran zu erzielen sowie eine Verletzung der Zellmembran durch eine scharfe Abrisskante an der Pipettenspitze zu verhindern, wurden die Pipettenspitzen nach dem zweiphasigen Ziehvorgang zusätzlich mit Hilfe einer Microforge (CPM-2 Coating/Polishing microforge, Scientific Instruments, New York, USA), durch deren Platin-Iridium-Draht ein Strom von 2,13 Ampere floss, hitzepoliert, indem die Pipettenspitze in die Nähe des Drahts herangebracht wurde. Die Pipetten sollten höchstens bis zu zwei Stunden nach Herstellung verwendet werden um einer Verschmutzung der Spitzen vorzubeugen.

#### **3.2.1.5 Agarbrücken**

In 50 ml 3 M KCl-Lösung wurden 1 bis 1,5 g Agar-Agar gegeben und im Wasserbad auf 80°C erwärmt bis der Agar sich vollständig auflöste. Mit dieser Lösung wurden die Glasbrücken mit Hilfe einer 2 ml Plastikspritze (Injekt®, Braun) luftblasenfrei gefüllt. Die Glasbrücken mit dem erstarrten Agar wurden in einer 150 mM KCl-Lösung bei 2-8°C aufbewahrt. Während der Versuche wurde die Aussparung der Agarbrücke mit 150 mM KCl-Lösung gefüllt und hier die Bezugselektrode eingesetzt.

#### **3.2.1.6 Elektroden**

Als Mess- und Bezugselektrode dienten jeweils chlorierte Silberdrähte, die Ag/AgCl-Elektrode. Die Chlorierung beider Elektroden erfolgte, in dem ein Silberdraht an die Anode einer 9 Volt Batterie angeschlossen und die Kathode mit einem Platin-Iridium-Draht verbunden wurde. Beide Drähte tauchten in eine 1 M KCl-Lösung ein, wodurch der

Silberdraht oxidiert und sich Silberchlorid auf der Oberfläche abscheidet. Die gleichzeitige Anwesenheit von elementarem Silber und Silberchlorid ermöglicht die Anwendung von chlorierten Silberdrähten für Strom- und Potentialmessungen. Da es bei den Messungen zur Ionenselektivität zu Einwirkungen der Referenzelektrode durch Schwankungen der Chlorid-Konzentration in der Badlösung kommen kann, wurde diese in eine 150 mM KCl-Lösung getaucht, die durch eine stromleitende Agarbrücke von der Badlösung isoliert war.

### 3.2.2 Aufbau des Messstands

Der Messstand, wie er für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente Verwendung fand, ist in **Abbildung 3.1** dargestellt und soll im Folgenden beschrieben werden:

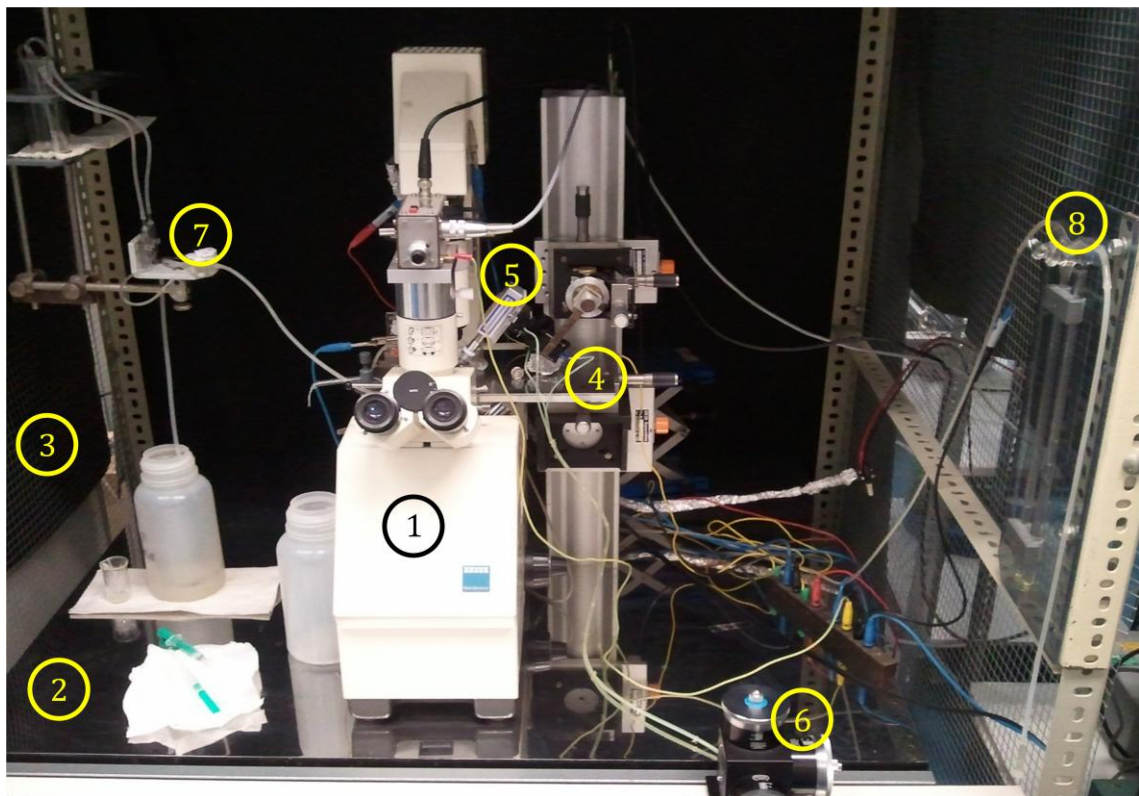


Abbildung 3.1 Patch-Clamp-Messplatz

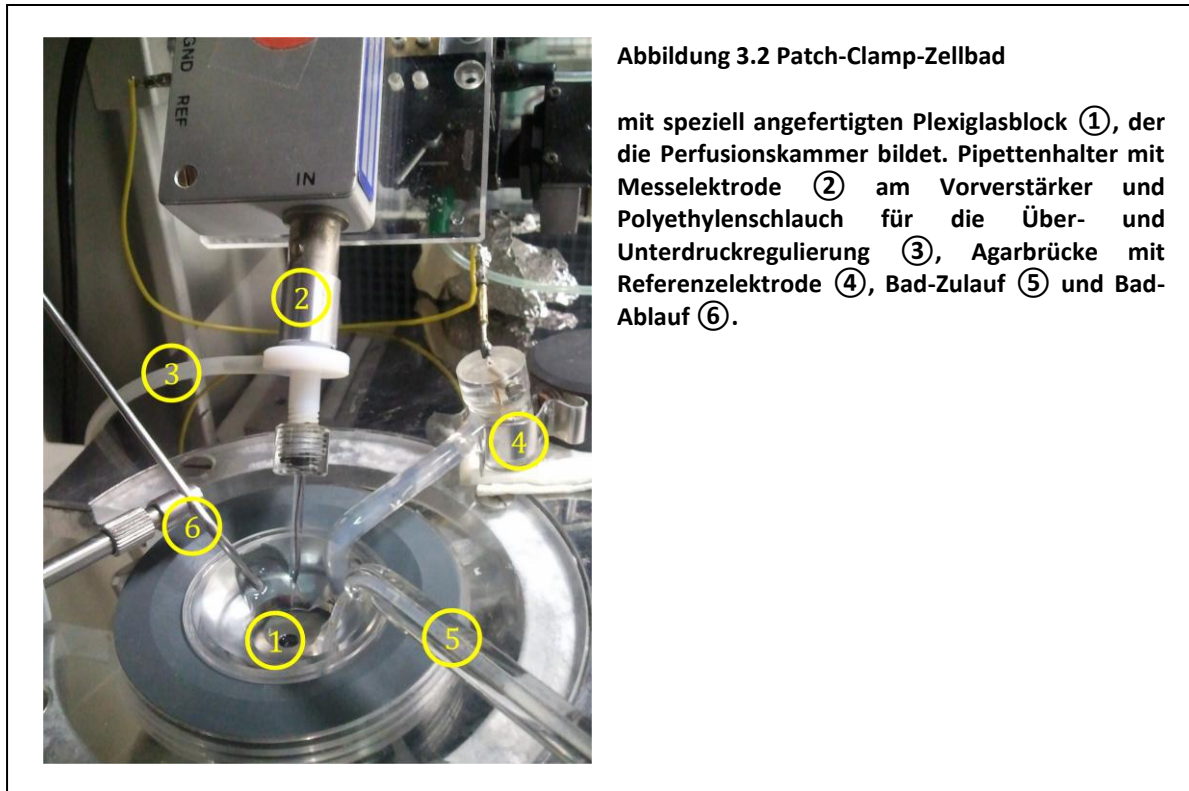
mit inversem Mikroskop ①, dem schwingungsgedämpften Tisch ②, dem Faraday-Käfig ③ sowie dem Objektstisch ④ mit integrierter Messkammer und Lösungszuleitungen. In die Messkammer ragt der Messkopf mit Pipettenhalter sowie Vorverstärker ⑤, gesteuert durch den Mikromanipulator ⑥. Des Weiteren erkennt man den Stämpli-Hahn ⑦ für den Lösungswechsel und den Dreiwege-Hahn zur Über- und Unterdruckregulierung ⑧.

Zur Beobachtung, der aus 3.1.3.1 gewonnenen Einzelzellen, befindet sich auf einem schwingungsgedämpften Messtisch (LT-100/80-A4SISA, Barry Controls), der die empfindlichen Patch-Clamp-Messungen vor mechanische Schwingungen schützt, ein

Mikroskop (Zeiss Axiovert 10 Mikroskop) bei welchem die Objektive unterhalb des zu betrachtenden Objekts angebracht sind. Deswegen bezeichnet man es auch als ein inverses Mikroskop. Oberhalb der Objektive befindet sich der Objektisch mit der lösungsdurchflossenen Perfusionskammer, in welche die Zellen während der Messung eingebracht wurden. Der Objektisch bewegt sich in horizontaler Ebene frei über den Objektiven. Lösungen, welche die Perfusionskammer bespülen, befinden sich in geeigneter Höhe (um den Fließdruck der Lösungszufuhr einzustellen) in offenen 50ml-Glasgefäßen und wurden von dort über Kunststoffschläuche bis in die Perfusionskammer geführt und durch eine pulsationsarme Schlauchpumpe (Minipuls 2, Gilson Abimed, Gambetta, France) wieder abgepumpt. Mit einem Vierwegehahn (Stämpfli-Hahn) erfolgte der Lösungswechsel. Als Zeitpunkt des Lösungswechsels wurde der Zufluss des ersten Tropfens des neuen Mediums in das Zellbad definiert. Eine Glastropfkammer jeweils vor dem Stämpfli-Hahn und nach der Absaugkanüle diente zur elektrischen Isolation des Zellbads. Das Zellbad bestand aus einer Zellkulturschale aus 3.1.3.1, in welcher mittig die zu messenden Zellen angewachsen waren. In diese Schale wurde ein passgenauer Plexiglasblock eingesetzt, der konisch ausgebohrt ist. Dadurch ergab sich eine zentrale Öffnung, in der sich die an der Zellkulturschale angewachsenen Zellen befanden. Drei separate, eingefräste Aussparungen in den Flanken des Plexiglasblocks ermöglichen Platz für die Agarbrücke, d.h. für die Referenzelektrode, Badzulauf sowie für die Absaugung. Diese Einheit aus Zellkulturschale und Plexiglasblock passte genau in eine im Objektisch integrierte Halterung (siehe **Abbildung 3.2**). Um die Patch-Pipettenelektrode, die über einem Pipettenhalter fixiert ist, mitsamt dem Vorverstärker (EPC-7, HEKA Elektronik) an die zu messende Zelle heranzuführen zu können, ist diese Einheit an einen hydraulischen, mit ölfüllten Mikromanipulator (XYZ-Kombination, Narishige Japan, Tokyo, Model: MO-103), welcher kontrollierte Bewegungen der Pipette in alle 3 Raumrichtungen erlaubt, angeschlossen. Senkrecht von oben findet die normale Beleuchtung des Objekts statt. Alle zuvor beschriebenen Messstandelemente sind von einem Faraday-Käfig umgeben, um sie gegen elektromagnetische Wellen von außen abzuschirmen oder das Rauschen im niederfrequenten Bereich (50 Hz/Netzbrummen) zu reduzieren und sind über einen EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker (List-electronic, Darmstadt, Germany) geerdet. In diesem Verstärker ist der elektrische Schaltkreis der Spannungsklemme realisiert (Der EPC-7 Verstärker ist mit der Probe samt Patch-Elektrode verbunden. Ein Analog-Digital-



Wandler, ebenfalls Teil des Verstärkers, dient als Schnittstelle zur Steuerung und Aufnahme über den Rechner).



### 3.2.3 Patch-Clamp-Technik und Ablauf eines Patch-Clamp-Experiments

Durch die von Neher und Sakmann im Jahre 1976 entwickelte Patch-Clamp-Technik wurde es möglich, elektrische Ströme und Potentialänderungen an lebenden Zellen zu registrieren (Neher und Sakmann 1976). In der vorliegenden Arbeit wurden Patch-Clamp-Experimente an frisch isolierten pankreatischen Beta-Einzelzellen der Maus durchgeführt. Nach der Inkubation der Einzelzellen unter den oben angegebenen Bedingungen wurden in deren Zellkulturschale der Plexiglasblock beide gemeinsam in die spezielle Halterung im Objektisch eingesetzt. Danach wurden sofort die Polyethylenschläuche des Zulaufs und der Absaugung justiert, damit die Einzelzellen kontinuierlich mit frischer EZ-Lösung (3.2.1.1) perfundiert werden. Um das Zellbad-System zu vervollständigen wurde die Agarbrücke mit der Referenzelektrode in die übrige freie Aussparung des Plexiglasblocks justiert.

Um das Füllen der frisch gezogenen Patch-Pipetten luftblasenfrei zu gewährleisten, wurden sie mit der für die jeweilige Konfiguration spezifischen Elektrolyt-Lösung, der sogenannten Pipettenlösung, gefüllt, indem sie kurz in ein Gefäß mit Pipettenlösung eingetaucht wurden, was als tip-filling bezeichnet wird. Die vorherrschenden Kapillarkräfte bewirken eine Füllung

der Pipettenspitze. Vom stumpfen Ende her wurde die Pipettenlösung mit Hilfe einer 2 ml Plastikspritze (Injekt®, Braun) durch einen Sterilfilter (Filtropur S plus 0,2 µM) und dann über einen schmalen Kunststoffschlauch hineingespritzt (back-filling), solange bis ungefähr ein Drittel der Patch-Pipette gefüllt war. Anschließend wurde die Pipette durch vorsichtiges seitliches Fingerklopfen von vorhandenen Luftblasen befreit. Somit konnte die Patch-Pipette in den Pipettenhalter des Vorverstärkers über die Messelektrode montiert werden. Über einen Polyethylenschlauch, der mit dem Pipettenhalter verbunden ist (siehe **Abbildung 3.2**), wurde über einen Dreiwege-Hahn ein Über- bzw. Unterdruck angelegt. Der Überdruck im Pipetteninneren sollte eine Ablagerung von Partikeln beim Eintauchen in die Badlösung vor der Pipettenöffnung verhindern, weil das eine spätere Sealbildung mit der Zellmembran zunichtemachen könnte. Ferner sollte der Überdruck eine Diffusion von Badlösung in die Pipette unterbinden. Mit dem Mikromanipulator wurde nun die Patch-Pipette unter Sichtkontrolle durch ein 40er Objektiv (Zeiss, LD ACHROPLAN; 40x/0,60) des inversen Mikroskops über der zu messenden Zelle zentriert und die Pipettenöffnung ganz vorsichtig auf die Zelle gesetzt. Der angelegte Überdruck wurde abgelassen und durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an den Pipettenhalter wurde die Zellmembran an die Pipettenöffnung angesaugt, sodass eine effektive Abdichtung von Pipette und Zellmembran gegenüber der Badlösung erreicht wurde, was man als Giga-Seal-Bildung bezeichnet. Wenn der Abdichtwiderstand im Gigaohm-Bereich ist, ist ein elektrischer Stromfluss nur noch in dem von der Pipettenöffnung umschlossenen Membranfleck (Patch) registrierbar. Es sind auch verschiedene Manipulationen mit dem Membranfleck möglich, ohne dass die Verbindung zwischen Zellmembran und Glaswand abreißt. Das beschriebene Aufsetzen der Patch-Pipette auf eine intakte Zelle mit Bildung eines Giga-Seals bezeichnet man als cell-attached-Konfiguration.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von der cell-attached-Konfiguration in der whole-cell (Hamill et al. 1981) und der perforated-patch Konfiguration (Horn und Marty 1988; Smith et al. 1990) praktisch gearbeitet. Die perforated-patch Konfiguration weist grundsätzlich die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie die konventionelle whole-cell Konfiguration auf (genauerer siehe unten). Somit kann der Gesamtstrom durch die Zellmembran und das Gesamtmembranpotential in der Zellmembran registriert werden. Für die nun fest etablierte Bezeichnung „perforated-patch Konfiguration“ wäre die Bezeichnung „perforated-whole-cell-Konfiguration“ präziser, weil die Bezeichnung „patch“

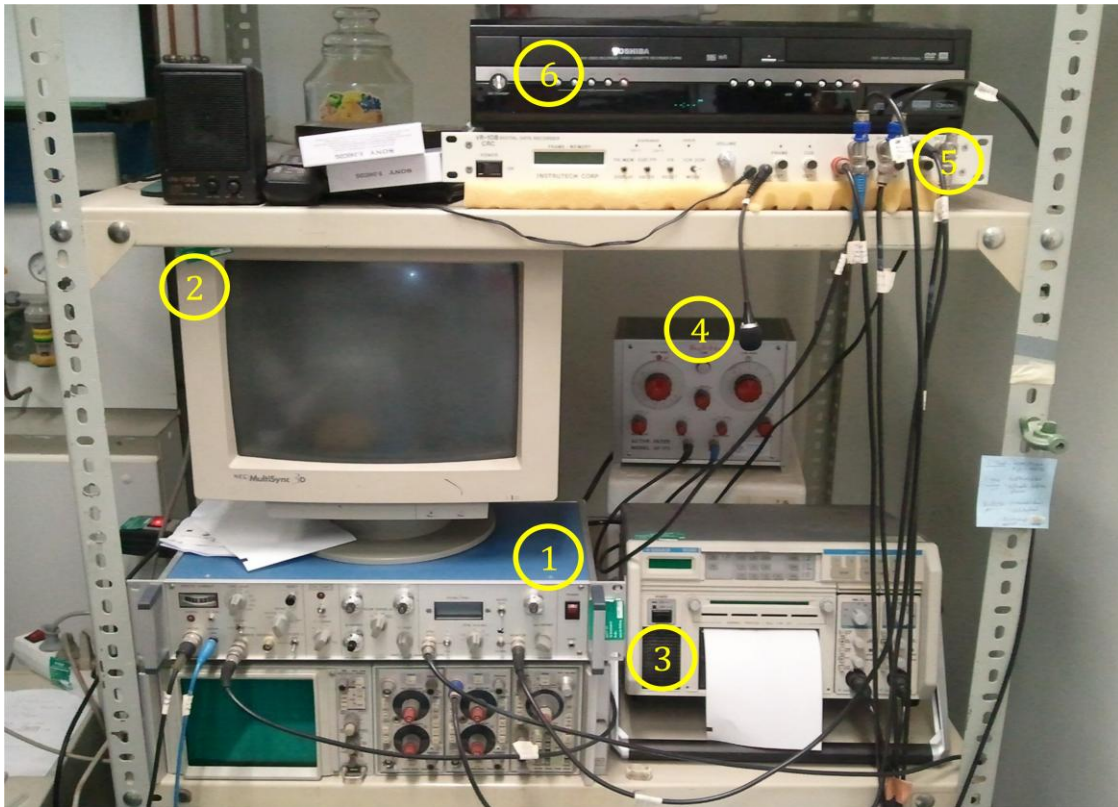
die Vermutung aufwirft, dass nur die Ströme eines begrenzten Membranflecks registriert werden können, wie es bei der inside-out sowie outside-out Konfiguration üblich ist.

Die whole-cell Konfiguration oder auch Ganz-Zell-Konfiguration wurde gewählt um das Membranpotential der Einzelzellen zu identifizieren und zusätzlich die Gesamtströme der Einzelzelle zu registrieren. Dabei wird von außen ein Unterdruck erzeugt, durch kurzes Saugen am Dreiwegehahn, unter der Pipettenöffnung befindenden Membranstück. Dadurch reißt die Membran auf, ohne dass dabei der Abdichtwiderstand sinkt. Es wird somit ein physikalischer Zugang zum Zellinneren sowie ein elektrischer Zugang zur Gesamtzellmembran erreicht. Durch Diffusion kommt es nun zu einem Austausch zwischen Pipettenlösung und Cytosol (Neher et al. 1983).

Die perforated-patch Konfiguration hat im Vergleich zu der konventionellen whole-cell Konfiguration den wesentlichen Vorteil, dass die Zusammensetzung des Cytoplasmas der zu messenden Zelle nur unwesentlich beeinflusst wird (Horn und Marty 1988), was eine Dialyse in der Zelle während der Versuchszeit unwahrscheinlicher macht. Der elektrische Zugang zum Intrazellulärraum wird durch Verwendung von Substanzen erreicht, die sich in die Zellmembran einlagern und dort kleine Löcher (Poren) ausbilden. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde das Polyen-Antimykotikum Nystatin verwendet, welches ionenselektiv-permeable Poren ( $\varnothing$ : ca. 0,8 nm) in der Zellmembran formt, sodass Stoffe, deren Molekulargewicht über 200-300 g/mol liegt, keine Möglichkeit haben, diese zu passieren (Walz 1995). Das heißt, alle Moleküle, die z.B. größer als Glucose sind, was für die meisten second messenger zutrifft, verbleiben im Cytoplasma und man erhält weitaus physiologischere Bedingungen als bei der whole-cell Konfiguration, weil nur kleine, einwertige Ionen hindurch diffundieren (Horn und Marty 1988). Sobald ein elektrischer Zugang zum Zellinneren besteht, sind Registrierungen des Membranpotentials unter Current-Clamp-Bedingungen sowie des Gesamtstroms unter Voltage-Clamp-Bedingungen realisierbar. Deutlich wird dieses durch eine Zunahme der Leitfähigkeit, indem sich Ionenkanäle öffnen und schließen. Diese beschriebene perforated-patch Konfiguration wurde das erste Mal an pankreatischen Beta-Einzelzellen der Maus durch Smith et al. (Smith et al. 1990) praktiziert.

Zur Registrierung der Ströme wurden ein EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker (List-electronic, Darmstadt, Germany) mit dem dazugehörigen Vorverstärker, ein PC und eine Patch-Clamp-

Software (pClamp 6.0.3 Software, Axon Instruments, Inc, USA) verwendet (siehe **Abbildung 3.3**). Die registrierten Ströme wurden durch einen aktiven Filter (AF 173, Thomatronik, Rosenheim, Germany) mit vier-poliger Besselcharakteristik gefiltert. Die Daten wurden mit einem Analog-Digital-Wandler (VR-10B, Instrutech Corporation, New York, USA) digitalisiert und auf Videokassetten gespeichert.



**Abbildung 3.3 Patch-Clamp-Messstand**

mit weiteren wichtigen Komponenten. Neben dem inversen Mikroskop, Vorverstärker und Mikromanipulator gehört zu der Grundausrüstung der Patch-Clamp-Verstärker ①, Computer mit pClamp-Software sowie Bildschirm ②, Schreiber mit Thermopapier ③, aktiver Filter ④, Analog-Digital-Wandler ⑤ und Videokassettenrecorder ⑥.

Parallel dazu erfolgte eine Versuchsaufzeichnung in Form eines Ausdrucks auf Thermopapier (Gould Teilenummer CL-213688, Gould-Nicolet) mittels eines Schnellschreibers (TA240 Easygraf, Modell 42-8240-10, Gould Instrument Systems) mit einem integrierten AC/DC-RMS-Verstärker (Modell: 13-6615-20). Die gewonnenen Daten aus den Versuchen wurden über die Interface-Card (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments) analog-digital gewandelt, gleichzeitig auf der Festplatte des Rechners abgespeichert und war somit für die spätere quantitative Datenauswertung abrufbar. Zur Auswertung diente das Programm Clampfit der

pClamp 6.03-Software. Zur statistischen Auswertung wurden die Daten in GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) exportiert und ausgewertet um die Versuchsergebnisse graphisch darzustellen. Sämtliche Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### ***3.2.3.1 Herstellung des Seals in der cell-attached Konfiguration***

Wie oben beschrieben wurde durch Annähern der Patch-Pipette an die Zellmembran ein Seal hergestellt. Hierbei wurde unter Voltage-Clamp-Bedingungen mit einem Haltepotential von 0 mV gearbeitet und die Ströme wurden mit 20 mV/pA verstärkt. Nach effektiver Sealbildung konnten Kanal-Öffnungen mit einem durchschnittlichen Stromfluss von 3 bis 4 pA registriert werden. Bei einem fixierten Haltepotential von 0 mV entspricht das Membranpotential dem Ruhemembranpotential der Zelle. In pankreatischen Beta-Einzelnzellen ist das Ruhemembranpotential größtenteils durch die Leitfähigkeit des  $K_{ATP}$ -Kanals bestimmt (Ashcroft und Rorsman 1989). Daher wurden beobachtete Kanal-Öffnungen, die mit Hilfe der pClamp Software sichtbar gemacht werden können, dem  $K_{ATP}$ -Kanal zugerechnet. Nach der erfolgreichen Herstellung der cell-attached Konfiguration wurden die entsprechenden elektrophysiologischen Versuche in dieser Arbeit jeweils mit der perforated-patch Konfiguration (3.2.3.2) und whole-cell Konfiguration (3.2.3.3) weiter durchgeführt.

### ***3.2.3.2 Durchführung und Auswertung der Messungen in der perforated-patch Konfiguration***

Die frisch gezogenen und hitzepolierten Patch-Pipetten wurden als erstes durch tip-filling mit einer Nystatin-freien Pipettenlösung für die perforated-patch Konfiguration (3.2.1.3) und darauffolgend durch back-filling mit einer Nystatin-haltigen Pipettenlösung gefüllt. Anschließend wurde wie oben beschrieben ein Giga-Seal in der cell-attached Konfiguration hergestellt. Die Verstärkung wurde am EPC-7 Verstärker von 20 mV/pA auf 2 mV/pA und das Stim-Scaling von 0,001 auf -0,1 verringert. Am aktiven Filter wurde das Low-Pass-Potentiometer von 5 auf 10 und der Multiplier von 1 kHz auf 10 kHz verstellt. Danach wurde ein Haltepotential von -70 mV durch  $V_{Hold}$  eingestellt, die Pipettenkapazität durch  $C_{Fast}$  abgeglichen und die Stromantwort auf den Testpuls beobachtet. Während das Nystatin in den von der Pipette umschlossenen Membranfleck diffundierte und Poren bildete, wurde die Ausbildung des elektrischen Zugangs zum Zellinneren durch die Zunahme der kapazitiven Ströme angezeigt. Eine Zunahme der kapazitiven Ströme ging mit der Möglichkeit einher, die

Zell-Kapazität mit  $C_{\text{slow}}$  und die Leitfähigkeit mit  $G_{\text{Series}}$  abzugleichen. Wenn eine Zunahme der kapazitiven Ströme beobachtet wurde und ein Abgleichen von Zellkapazität sowie Leitfähigkeit möglich war, wurde das Membranpotential unter Current-Clamp-Bedingungen gemessen. Bis hierher vergingen nach Sealbildung durchschnittlich 20 bis 40 Minuten. Die gemessene Zellkapazität betrug zu Versuchsbeginn durchschnittlich 7,0 pF und die durchschnittliche Leitfähigkeit lag bei 0,04  $\mu\text{S}$ . Die Leitfähigkeit wird durch die Anzahl und Größe der durch Nystatin generierten Poren bestimmt, d.h. je mehr Poren ausgebildet wurden, umso größer war die registrierte Leitfähigkeit. Das Experiment wurde gestartet, wenn die Zelle ein Ruhemembranpotential von -60 mV oder geringer aufwies. Zeitgleich wurde bei jedem Start der Versuchsverlauf durch einen Videokassettenrekorder aufgenommen. Zur Durchführung diente Fetchex der pClamp 6.03-Software.

Zur genauen Bestimmung des Membranpotentials wurden einzelne Versuchsabschnitte von je 10 Sekunden von der Festplatte in das Programm Clampfit eingelesen. Der horizontalen Cursor wurde in die horizontale Mitte der eingelesenen Registrierung gelegt und der entsprechende Wert des Membranpotentials abgelesen. Traten während des Versuchsabschnitts Aktionspotentiale auf, wurde jeweils für das Plateau und das Amplitudenmaximum des Aktionspotentials ein Wert bestimmt.

### ***3.2.3.3 Durchführung und Auswertung der Messungen in der whole-cell Konfiguration***

Die frisch gezogenen und hitzepolierten Patch-Pipetten wurden als erstes durch tip-filling sowie durch back-filling mit einer Pipettenlösung für die whole-cell Konfiguration (3.2.1.2) gefüllt. Anschließend wurde wie oben beschrieben ein Giga-Seal in der cell-attached Konfiguration hergestellt. Die Verstärkung wurde am EPC-7 Verstärker von 20 mV/pA auf 2 mV/pA und das Stim-Scaling von 0,001 auf -0,1 verringert. Am aktiven Filter wurde das Low-Pass-Potentiometer von 5 auf 10 und der Multiplier von 1 kHz auf 10 kHz verstellt. Danach wurde ein Haltepotential von -70 mV durch  $V_{\text{Hold}}$  vorgegeben und die Pipettenkapazität durch  $C_{\text{Fast}}$  abgeglichen. Anschließend wurde ein Unterdruck durch kräftiges Saugen an dem Dreiwege-Hahn, der mit dem Pipettenhalter verbunden ist, angelegt, der höher ist als bei der Sealherstellung benötigte, wodurch die Cytoplasmamembran durchbrochen werden konnte. Dadurch ist die Pipette mit dem Cytosol elektrisch leitend verbunden. Hierbei herrscht zwischen Silber/Silberchloridelektrode und Cytosol ein Widerstand, der als Serienwiderstand bezeichnet wird. Der Serienwiderstand ist meistens höher als der reine

Pipettenwiderstand, weil beim Durchbrechen der Zellmembran Membranbestandteile und sogar Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette gezogen werden. Oft wird auch der Kehrwert des Serienwiderstandes, die Leitfähigkeit mit der Einheit Siemens (S) verwendet (Numberger und Draguhn 1996). Der Serienwiderstand und die Zellkapazität wurden durch Bedienen von  $G_{\text{Series}}$  und  $C_{\text{Slow}}$  am Patch-Clamp-Verstärker abgeglichen. Jetzt konnte unter Current-Clamp- (CC) oder unter Voltage-Clamp- (VC) Bedingungen gearbeitet werden. Diese beiden Modi wurden über einen Modusschalter am Patch-Clamp-Verstärker gesteuert.

Messungen unter VC-Bedingungen erfolgten bei einem fest vorgegebenen Haltepotential, welches durch  $V_{\text{Hold}}$  am Verstärker manuell festgelegt wird. Wenn Stromfluss durch die Cytoplasmamembran Abweichungen von diesem ausgewähltem Haltepotential bewirkt, erzeugt der Patch-Clamp-Verstärker einen Strom, der den Strom durch die Cytoplasmamembran kompensieren kann und damit das Potential konstant hält. Die Ströme über die Cytoplasmamembran werden also durch die Erzeugung eines quantitativ gleichen Gegenstroms durch den Verstärker sichtbar gemacht. In der whole-cell Konfiguration sind keine Einzelionenkanäle messbar, sondern es wird der Gesamtstrom der Einzelzelle, der durch die Cytoplasmamembran fließt, registriert. Mit Hilfe des Programms Clampex wurde mittels des Stimulationsprotokolls nach Trube (Trube et al. 1986) vorgegangen. Dabei wurde durchgehend von dem für den jeweiligen Versuch interessanten Haltepotential für jeweils 200 ms das Haltepotential um 10 mV depolarisiert und nach einer Pause von 1060 ms, in der wieder das vorgegebene Haltepotential vorlag, um 10 mV hyperpolarisiert.

Um spontan das Membranpotential der Einzelzelle zu messen, wurde der Modusschalter des Patch-Clamp-Verstärkers von Voltage-Clamp (VC) auf Current-Clamp (CC) umgestellt. Hierbei wurde der Strom konstant gehalten, der sich bei null befindet. Durch Umschaltung auf CC-Bedingungen werden im EPC-7 Verstärker die  $R_s$ -Kompensation und die Abgleichungen durch  $C_{\text{Slow}}$  und  $C_{\text{Fast}}$  außer Kraft gesetzt (Sigworth 1986, S.49).

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms Clampfit wie im Abschnitt Auswertung der whole-cell Versuche unter Current-Clamp-Bedingungen beschrieben.

### 3.3 Mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pankreasinseln der Maus

#### 3.3.1 Medien für mikrofluorimetrische Messungen

##### 3.3.1.1 Basismedium

Als Medium für die mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pankreasinseln der Maus diente ein modifizierter HEPES-haltiger Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer. Dieser wurde im Gegensatz zu der für die Inselisolierung verwendeten Krebs-Ringer-Lösung nicht steril filtriert, sondern täglich frisch aus den Stammlösungen 1 bis 7 angesetzt. Zur pH-Äquilibration und Oxygenierung wurde diese vor der Verwendung ca. 30 Minuten mit Carbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) begast und gleichzeitig auf 37°C temperiert.

*a) Stammlösung 1 (0,90% NaCl):*

18,000 g Natriumchlorid (Fa. AppliChem, Darmstadt,  $M_r = 58,44 \text{ g/mol}$ ) wurden in 2 l Aqua bidest. gelöst.

*b) Stammlösung 2 (1,15% KCl):*

5,750 g Kaliumchlorid (Fa. Roth, Karlsruhe,  $M_r = 74,56 \text{ g/mol}$ ) wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

*c) Stammlösung 3 (1,62%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ):*

8,100 g Calciumchlorid-Dihydrat (Fa. Merck, Darmstadt,  $M_r = 147,02 \text{ g/mol}$ ) wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

*d) Stammlösung 4 (2,11%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ):*

5,275 g Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Merck, Darmstadt,  $M_r = 136,09 \text{ g/mol}$ ) wurden in 250 ml Aqua bidest. gelöst.

*e) Stammlösung 5 (3,82%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ):*

9,550 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Fa. Merck, Darmstadt,  $M_r = 246,48 \text{ g/mol}$ ) wurden in 250 ml Aqua bidest. gelöst.

*f) Stammlösung 6 (1,30%  $\text{NaHCO}_3$ ):*

13,000 g Natriumhydrogencarbonat (Fa. Merck, Darmstadt,  $M_r = 84,01 \text{ g/mol}$ ) wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst.

Die Stammlösungen 1 bis 6 wurden bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert und verwendet.



*g) Stammlösung 7 (HEPES-Lösung ohne Albumin):*

38,7 g HEPES (Fa. Roth, Karlsruhe,  $M_r = 238,31$  g/mol) wurden in 125 ml Aqua bidest. gelöst und mit 1N NaOH ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Das Volumen wurde mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt und diese entstandene HEPES-Lösung in 10 ml Portionen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert und hatte eine Aufbewahrungsfrist von 4 Monaten.

Vor der Herstellung des Basismediums wurden die Stammlösungen 1-7 auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden die einzelnen Stammlösungen mit den jeweiligen Volumenanteilen vereint, sodass sich das Basismedium bei einem Endvolumen von 78 ml folgendermaßen zusammensetzt:

	Volumen (ml)	Endkonzentration
<b>Stammlösung 1 (0,9% NaCl)</b>	60,0	118,5 mM
<b>Stammlösung 2 (1,15% KCl)</b>	2,4	4,7 mM
<b>Stammlösung 3 (1,62% <math>\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}</math>)</b>	1,8	2,5 mM
<b>Stammlösung 4 (2,11% <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>)</b>	0,6	1,2 mM
<b>Stammlösung 5 (3,82% <math>\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}</math>)</b>	0,6	1,2 mM
<b>Stammlösung 6 (1,3% <math>\text{NaHCO}_3</math>)</b>	10,2	20,1 mM
<b>Stammlösung 7 (154 mM NaOH + 324,5 mM HEPES)</b>	2,4	10,0 mM

Stammlösung 7 wurde als reine HEPES-Lösung ohne Albumin eingesetzt um unnötige Schaumbildung in den Schlauchsystemen zu vermeiden.

In allen mikrofluorimetrischen Messungen diente ein 5 mM Glucose-haltiger KR-Puffer als Basismedium, sodass zusätzlich 77,29 mg von **D-Glucose-Monohydrat** (Fa. Merck, Darmstadt,  $M_r = 198,17$  g/mol) abgewogen und in der oben beschriebene Rezeptur von 78 ml gelöst wurde.

Um eine ausreichende Oxygenierung der Krebs-Ringer-Lösung zu gewährleisten wurde diese während des gesamten Versuchsablaufs mit Carbogen begast.

### **3.3.1.2 Stamm- und Inkubationsmedien des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes**

1. **Fura-PE3/AM (Fa. Mobitec, Göttingen, Deutschland),  $M_r = 1258,0$  g/mol:**

**Fura-PE3/AM-Stammlösung (1 mM):** Es wurden 50  $\mu$ g Fura-PE3/AM in 50  $\mu$ l wasserfreiem DMSO gelöst und kurz gevortext. Lagerung bei  $\leq -20^\circ\text{C}$ .

2. **Fura-PE3/AM-Inkubationsmedium (2  $\mu$ M):** Es wurden 2  $\mu$ l der Fura-PE3/AM-Stammlösung zu 998  $\mu$ l Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

### **3.3.2 Fluoreszenz ionensensitiver Farbstoffe**

Damit ein Molekül fluoresziert müssen bestimmte strukturelle Voraussetzungen existieren, wie z.B. eine starre räumliche Anordnung der Atome innerhalb eines Moleküls, die in planaren, polycyclischen Aromaten und annellierten Ringsystemen der Heteroaromaten (Pyridin, Indol, Chinolin, etc.) realisiert sind oder Molekülstrukturen mit konjugierten Doppelbindungen oder Carbonyl-Bindungen sowie Chelatkomplexe mit mehrwertigen Ionen. Elektronendonatoren an einem annellierten Ringsystem begünstigen noch zusätzlich die Fluoreszenz. Bei der Fluoreszenzanregung kommt es zu einem direkten Übergang der angeregten Elektronen des  $\pi$ -Elektronensystems, der essentielle  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bzw. der n-Elektronen freier Elektronenpaare, der  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang aus dem untersten Schwingungsniveau  $V = 0$  des Elektronenanregungszustandes  $S_x$  in den energiearmen Grundzustand  $S_0$ . Die strukturellen Voraussetzungen wurden von den beiden in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten Fluoreszenzindikatoren, Fura-PE3/AM und BCECF-AM (3.4.2), erfüllt.

#### **3.3.2.1 Fluoreszenzindikatoren Fura-2/AM und Fura-PE3/AM**

In den achtziger Jahren wurden fluoreszierende Moleküle mit einer hohen Affinität gegenüber bi- und trivalenten Kationen entwickelt (Kasten 1993). Fluoreszenzindikatoren binden mit ihren funktionellen Gruppen das freie Kation und verändern dabei in Abhängigkeit dieses Kations ihre Fluoreszenzeigenschaften, sodass eine Abnahme oder Zunahme der Fluoreszenz resultiert. Um die cytosolische Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu messen, hat sich als populärster Fluoreszenzindikator Fura-2/AM etabliert. Diese Substanz bindet mit seinen vier Carboxyl-Gruppen sehr selektiv  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und ist fast unempfindlich gegenüber pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ist auch sehr günstig für physiologische Messungen, weil die Dissoziationskonstante des Furas-2 etwa 0,25

$\mu\text{M}$  beträgt, d.h. in dem Bereich vieler zellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (0,1-1  $\mu\text{M}$ ). Die Stilbengruppe bildet das Chromophor bzw. Fluorophor des Moleküls (Grynkiewicz et al. 1985).

Wie kann nun die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in intakten frisch isolierten mit Fura-beladenden Pankreasinseln gemessen werden? Bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm liegt ein starker Signalzuwachs mit Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vor, während bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität verbunden ist (Haugland 1992). Bei 360 nm liegt der sogenannte isosbestische Punkt. Hier ist die Fura-Fluoreszenz unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die Emission bleibt konstant bei 510 nm. Werden die Fluoreszenz-Intensitäten des Fura-2 bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm alternierend gemessen, ist der Quotient  $F_{340}/F_{380}$  nur noch von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der den Farbstoff enthaltenen Lösung abhängig. Auf diesem beruht die häufige Verwendung als Fluoreszenzindikator zur quantitativen Messung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei einem 2 Wellenlängen-Verfahren. Da sich herausgestellt hat, dass die mit Fura-2 gemessene cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration keine einheitliche Größe ist (Simpson 1999), wird häufig auf eine prinzipiell mögliche Kalibrierung verzichtet und nur die Fura-Fluoreszenz-Ratiowerte angegeben, so auch in dieser Arbeit.

Damit Fura-2 durch die Zellmembran permeieren kann sind die hydrophilen Carboxyl-Gruppen des Moleküls mit Acetoxymethyl-Gruppen verestert (sogenannte AM-Ester). Durch diese daraus resultierende erhöhte Lipophilie kann Fura-2/AM in der Inkubationszeit durch die Zellmembran diffundieren und im Cytosol akkumulieren. Dort werden die Acetoxymethylestergruppen durch unspezifische cytosolische Esterasen gespalten und der Farbstoff in seine hydrophile Form umgewandelt, sodass er im Cytosol verbleibt. Fura-2 als freie Säure diffundiert nun nicht mehr aus der Zelle heraus, d.h. die Konzentration des Farbstoffmoleküls in der Zelle übersteigt die Inkubations-Konzentration um ein Vielfaches, zumal durch die cytosolische AM-Abspaltung der Gradient des AM-Farbstoffes erhalten bleibt. Eine zu lange Inkubationsdauer sowie eine zu hohe Inkubations-Konzentration des Fluoreszenzindikators sind dabei kritisch zu bewerten, weil die cytosolischen Esterasen übersättigen. Die AM-Farbstoffmoleküle besitzen dann eine verlängerte Lebensdauer im Cytosol und sind somit in der Lage auch durch Membranen von Zellkompartimenten zu diffundieren. Die Konsequenz wäre z.B. eine zusätzliche Messung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des endoplasmatischen Retikulums. Ein

wesentliches Problem bei der Verwendung von Fura-2 besteht aber darin, dass dieser Fluoreszenzindikator die Neigung besitzt, sich nach einer gewissen Zeit in der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form aus den Zellen freizusetzen. Es kommt zum sogenannten „leakage“ (Jakob et al. 1998; Manzini und Schild 2003). Diese Abnahme der Konzentration des mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion gebundenen Indikators führt letztendlich zum Verlust der Fluoreszenzintensität und dadurch zu Fehlinterpretationen des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels. Durch die Entwicklung des Fluoreszenzindikators Fura-PE3/AM der Arbeitsgruppe um Dr. Poenie in Austin, Texas im Jahr 1995, konnte dieses Problem minimiert werden, weil Fura-PE3/AM zusätzlich ein Piperazinring besitzt, dessen Stickstoff mit der benachbarten Carboxyl-Gruppe zur Bildung eines Zwitterions führt. Dadurch ist Fura-PE3/AM im Vergleich zu Fura-2/AM nach der cytosolischen Veresterung polarer und verbleibt somit länger im Cytosol. Als Derivat von Fura-2 ist Fura-PE3/AM ( $K_D = 0,25 \mu\text{M}$ ) ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Fluoreszenzindikator. Er zählt heutzutage zu den empfindlichsten und populärsten Fluoreszenzindikatoren. Da die Anregungswellenlänge und die Emissionswellenlänge nach Hydrolyse mit denjenigen des Fura-2 identisch sind, kann Fura-PE3/AM den Fluoreszenzindikator Fura-2/AM ohne zusätzlichen technischen Aufwand ersetzen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Fura-PE3/AM gearbeitet.

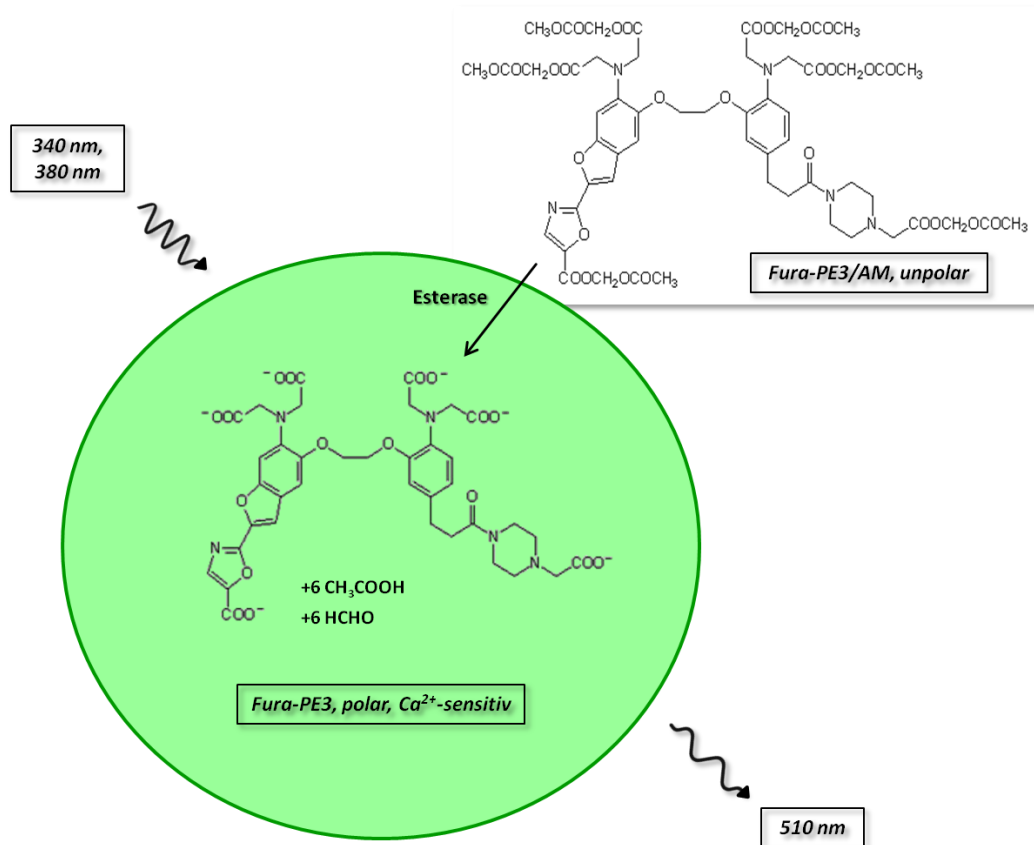


Abbildung 3.4 Schema einer Inselbeladung mit dem Fluoreszenzindikator Fura-PE3/AM

### 3.3.2.2 Die Beladung der Pankreasinseln mit einem Fluoreszenzindikator

Bei der Beladung der Pankreasinseln spielt die Konzentration des Fluoreszenzindikators eine entscheidende Rolle. Ist sie zu niedrig, so ist ein geringes Fluoreszenzsignal die Folge. Ist sie zu hoch, kommt es zu einer Abpufferung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und zudem zu einer Schädigung der in den Inseln vorhandenen Beta-Zellen durch Abbauprodukte der Esterhydrolyse. Nach einer Kultivierungsdauer von mindestens 72 h erfolgte die Beladung der Langerhans'schen Inseln direkt vor dem geplanten Experiment. Die Pankreasinseln wurden 45 bis 50 Minuten mit Fura-PE3/AM-Inkubationsmedium ( $2 \mu\text{M}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  sowie permanenter Carbogen-Begasung abgedunkelt beladen.

Für die Beladung und Verwendung im Experiment eigneten sich rundliche Pankreasinseln mit kleinem Durchmesser, die weitestgehend in der Mitte des Deckgläschens fest angewachsen und frei von exokrinem Gewebe waren (Gilon et al. 1994; Ravier et al. 2002).

### 3.3.3 Messstandaufbau für mikrofluorimetrische $\text{Ca}^{2+}$ -Messung

Als Standardverfahren für die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in pankreatischen Mausinseln lässt sich die ratiometrische Messung mittels eines Fluoreszenzindikators Fura-2 oder Fura-PE3/AM bezeichnen (Grynkiewicz et al. 1985). In dieser Arbeit wurde die Messung mit einem  $2\lambda$ -Verfahren durchgeführt. Damit kann die Fluoreszenz eines Farbstoffs nach Exzitation mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen werden, sodass der Quotient R (Ratio) zweier Fluoreszenzintensitäten ( $F_1$  und  $F_2$ ) gebildet werden kann. Die auf diese Weise ermittelte Fluoreszenzintensität ist somit nur von der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig und unabhängig von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes (zur genauen Herleitung s. (Grynkiewicz et al. 1985)). Voraussetzung ist die Wahl des richtigen Fluoreszenzfarbstoffes. Für das  $2\lambda$ -Verfahren werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, deren Anregungsspektren sich nach Bindung des Liganden  $\text{Ca}^{2+}$  an den Farbstoff zu anderen Wellenlängen hin verschieben („shift“). Für solche cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbestimmungen eignet sich der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM (Grynkiewicz et al. 1985). Aufgrund der unter 3.3.2 aufgeführten Voraussetzungen wurde in allen durchgeführten Experimenten zur Bestimmung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Fluoreszenzindikator Fura-PE3/AM verwendet. Mit Hilfe des von der Firma Leitz hergestellten „Orthoplan“-Mikroskop wurde eine für ratiometrische Fluoreszenzmessungen notwendige Exzitation des Fluoreszenzindikators Fura-PE3/AM bei zwei verschiedenen Wellenlängen (340 nm und 380 nm) gewährleistet. Die Verwendung von Fura-PE3/AM als Fluoreszenzindikator bringt aber auch hohe Anforderungen an die Erzeugung des Anregungslichtes mit sich:

1. Die Fluoreszenzintensität ist in entscheidender Weise von der Anregungswellenlänge abhängig.
2. Pro Messzeitpunkt werden kurz aufeinanderfolgend zwei verschiedene Wellenlängen benötigt, d.h. die Probe muss mit Licht alternierender Wellenlänge angeregt werden (Excitation-Ratioing).

Diese beiden Voraussetzungen werden durch den Einsatz einer leistungsstarken Hochdruckgasentladungslampe, der Xenonlichtbogenlampe, als Mikroskoplichtquelle und zweier verschiedener Quarzfaserlichtleiter realisiert. Denn die Xenonlichtbogenlampe enthält in ihrem Emissionsspektrum die Anregungswellenlängen des Fluorophors Fura-

PE3/AM und garantiert somit eine nahezu konstante Fluoreszenzanregung, weil das Spektrum der Xenonlichtbogenlampe eine relativ konstante Strahlungsintensität in dem Wellenlängenbereich von ungefähr 300 nm bis 650 nm aufweist. Durch die Projektion der Anregungsstrahlung auf zwei verschiedene Quarzfaserlichtleiter wurde die notwendige Exzitation des Indikators Fura-PE3/AM bei zwei verschiedenen Wellenlängen gewährleistet. Eine zeitgesteuerte Öffnung mit einer einminütigen Taktfrequenz, die dem Erregerlicht den Strahlengang auf ein Beugungsgitter ermöglichte, wurde durch zwei programmierbare Schnellverschlüsse (Uniblitz-Shutter mit Kontrolleinheit VMMD-1), die als Verschluss der Quarzfaserlichtleiter dienten, gesteuert. Das Beugungsgitter wiederum dient als Monochromator, an dessen Gitterkanten das breite Spektrum des von der Xenonlampe erzeugten Lichtes reflektiert bzw. gebeugt und so in die einzelnen Wellenlängen aufgespaltet. Durch die einstellbare Winkелеinstellung zwischen beiden Quarzfaserlichtleitern und Beugungsgitter war es möglich, ganz variabel die 2 verschiedenen für den Fluoreszenzindikator relevanten Wellenlängen zu erzeugen. Die jeweils gewählte Wellenlänge wurde in den aus dem Beugungsgitter führenden Quarzfaserlichtleiter weiter geleitet. Das distale Ende dieses Lichtleiters ist direkt in das Lampenhaus des Epifluoreszenzmikroskops (Leitz Orthoplan) eingekoppelt. Insofern stand monochromatisches Licht, d.h. Licht einer einzigen Wellenlänge, für die Exzitation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatkomplexe zur Verfügung. In diesem Fall Licht von einer Wellenlänge von 340 nm und Licht von einer Wellenlänge von 380 nm. Die monochromatischen Exzitationswellenlängen erreichten so das Mikroskop und trafen auf einen dichroitischen Strahlenteiler (auch dichromatischer Teilerspiegel bzw. „chromatic beam-splitter“, abgekürzt CBS) mit einer Teilerkante von 400 nm und einem Langpassfilter mit einer Kante von 460 nm. Die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht wird mittels dieses dichroitischen Teilerspiegels aus folgenden Gründen verwendet:

1. Der dichroitische Spiegel ist im Epifluoreszenzkondensor (Leitz Ploemopak 2.1 Modul) in einem 45°-Winkel im Strahlengang fixiert (siehe **Abbildung 3.6**) und das monochromatische Exzitationslicht (340 nm bis 380 nm) wurde dadurch um 90° in Richtung auf das Objekt umgelenkt.
2. Dieser Beam-Splitter reflektiert Licht kurzwelliger Strahlung (< 500 nm, d.h. das Anregungslicht der Fluoreszenz) und lässt längerwelliges Licht (> 500 nm, d.h. das

Emissionslicht der Fluoreszenz) passieren, sodass das durch das Fura-PE3/AM erzeugte Fluoreszenzlicht von 510 nm Wellenlänge den dichroitischen Spiegel passieren kann und gleichzeitig verhindert wurde, dass das Anregungslicht zum Detektor strahlt.



**Abbildung 3.5** Messplatz für mikrofluorimetrische  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung

mit Hochspannungsgerät ① für die Xenonlichtbogenlampe ② weiterhin im Kasten enthalten Beugungsgitter und Quarzfaserlichtleiter, Uniblitz- Shutter ③ und dessen Steuerelement? ④, Orthoplan-Mikroskop (Epifluoreszenzmikroskop) ⑤ und der Computer zur Datensicherung der Bildpaare sowie Bearbeitung dieser zur Kinetikberechnung mit Hilfe von Fucal ⑥.

Des Weiteren zeichnet sich ein  $2\lambda$ -Mikroskop durch eine hohe Variabilität der einzelnen Module, wie z.B. einer möglichen Wahl verschiedener Farbteiler-Spiegel aus. Es kann sowohl als Durchlichtmikroskop und als Auflicht- bzw. Epifluoreszenzmikroskop verwendet werden. Der entscheidende prinzipielle Vorteil der Epifluoreszenzmikroskopie ist die Verwendung eines einzigen Linsensystems, welches als optisches System gleichzeitig die Fokussierung der Anregungsstrahlung auf das Objekt (Kondensorfunktion) als auch die Kollektion der emittierten Fluoreszenzstrahlung (Objektiv) gewährleistet. Auf diese Weise kann das Auftreten von Störlicht reduziert werden. Als Objektiv wurde dazu ein Zeiss Fluar (40x, 1,3



numerische Apertur,  $\infty/0,17$ ) verwendet, das auch bei einer Wellenlänge von 340 nm noch eine relativ hohe Transmission aufweist, sodass nur mit einem geringfügigen Verlust an emittierter Strahlung zu rechnen ist. Es wurde als Ölimmersionsobjektiv verwendet. Als bildgebender Detektor fungierte die slow-scan CCD-Kamera (charge coupled devices) mit der die Fluoreszenzbilder bei 340 und 380 nm Anregungswellenlänge aufgenommen und nach Beendigung des Versuches die Fluoreszenz-Ratio des Bildes durch Pixel pro Pixel Division berechnet wurde. Die Kinetik wurde durch den Einsatz eines speziellen Computerprogramms (Fucal, TILL-Photonics, Gräfeling) direkt aus den registrierten Ratiowerten erstellt (siehe 3.3.3.2).

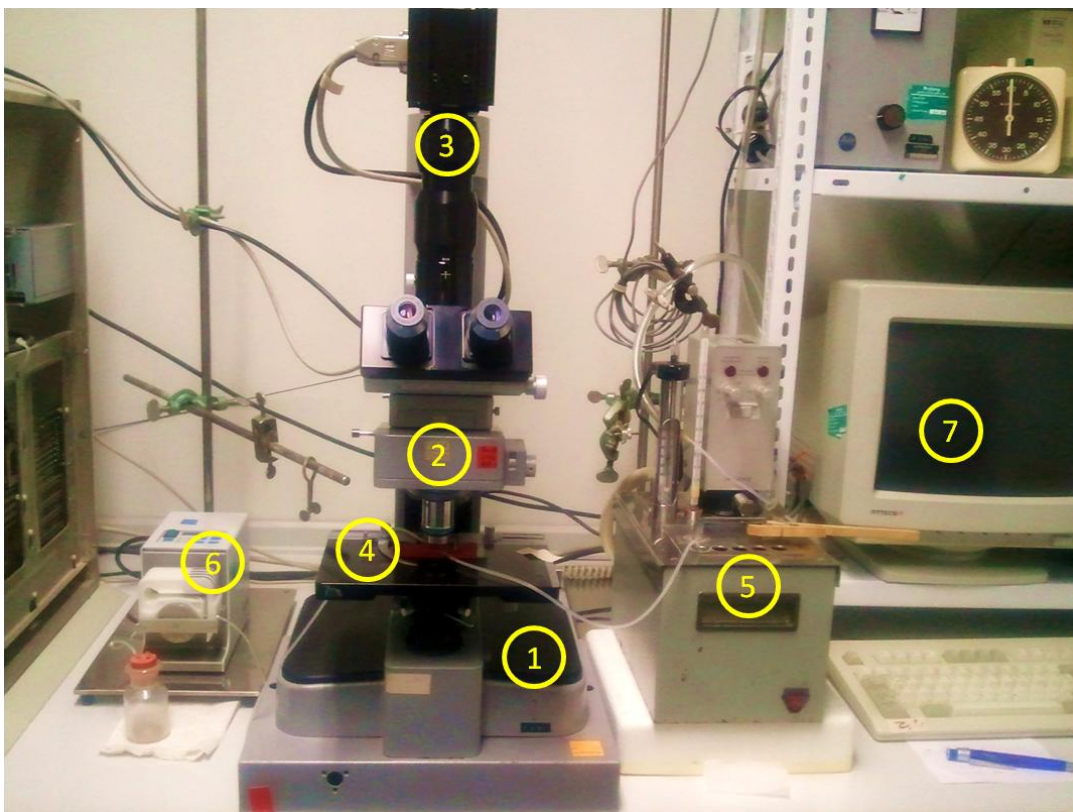


Abbildung 3.6 Messplatz für mikrofluorimetrische  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung

mit Epifluoreszenzmikroskop ①, Epifluoreszenzkondensor, in dem sich der dichroitische Teilerspiegel befindet ②, als bildgebender Detektor die CCD-Kamera ③ Objektträger mit Umströmungskammer ④, wobei der Zufluss (rechts) aus dem im Wasserbad ⑤ befindenden Medium und der Abfluss (links) durch eine peristaltische Pumpe ⑥ angetrieben wird und ein geschlossenes System bilden, Computerbildschirm zur Erstellung von „regions of interest“ (ROI) mit Hilfe des Fucal-Programms ⑦.

### **3.3.3.1 Praktische Durchführung der Fluoreszenzmessungen**

In der Beladung der isolierten Pankreasinsel der Maus wurde als Nährmedium der KR-Puffer mit einer Glucosekonzentration von 5 mM verwendet. Die Umströmung der Pankreasinseln fand in einem geschlossenen System statt und es wurde dafür ein aufrechtes Orthoplan Mikroskop verwendet. Die Umströmungskammer stellt eine speziell konstruierte Kunstharzkammer dar, die in der Mitte eine Vertiefung aufweist. Um diese Vertiefung herum wurde Laborfett (Glisseal®, Fa. Borer Chemie AG, Zuchwil, Schweiz) aufgetragen, welches das Deckgläschen nach dem Auflegen fixierte und die Umströmungskammer abdichtete. Dabei wurde das Deckgläschen so auf die mit dem KR-Medium mit 5 mM Glucose gefüllte Umströmungskammer gelegt, dass die Seite mit den angewachsenen, Fura-beladenen Inseln nach unten zeigte. Mittels einer auf der abfließenden Seite der Umströmungskammer befindlichen peristaltischen Pumpe (Ismatec SA, Typ: ISM597D, Schweiz) wurde gleichmäßig vorgewärmtes Medium aus einem Vorratsgefäß in die Kammer gesogen, sodass eine möglichst luftblasenfreie Befüllung der Umströmungskammer gewährleistet wurde. Nach Aufbringen eines Tropfens fluoreszenzfreiem Immersionsöl (Carl Zeiss AG, Jena;  $n_D=1,518$ ) wurde die zu messende Langerhans'sche Insel im Durchlicht fokussiert. Zur exakten und endgültigen Positionierung sowie Fokussierung aus der Sicht der CCD-Kamera wurde ein Schwarz-Weiß-Monitor verwendet. Um eine physiologische Funktionsfähigkeit der Pankreasinseln zu gewährleisten, ist eine möglichst genaue Einhaltung der Temperatur von 37°C für die Umströmungslösungen während der Experimente entscheidend (Nadal et al. 1994). Dafür wurden die Umströmungsmedien unter Verwendung eines Wasserbads und das Objektiv mit einer stromdurchflossenen Widerstandsfolie erwärmt. Da die Umströmungskammer mit Deckgläschen über das Immersionsöl mit dem Objektiv in Kontakt steht, soll an dieser Stelle ohne Gegenmaßnahmen ein Wärmeabfluss vermieden werden. Um eine möglichst geringe Abweichung von der Objekttemperatur während der Perifusion zu gewährleisten, wurde das Wasserbad auf 44-46°C und die Widerstandsfolie am Objektiv auf 52°C temperiert. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen lag die gemessene Temperatur in der Umströmungskammer zwischen 35-36°C. Um Messfehler durch Fremdlicht zu minimieren bzw. optimale Fluoreszenzmessbedingungen zu gewährleisten, wurde das Labor während der Messungen abgedunkelt. Die Fluoreszenz der Bildpaare konnte nun im Abstand von einer Minute aufgenommen werden. Das Basalmedium enthielt immer 5 mM Glucose und die Stimulationsmedien enthielten die Testsubstanzen in der

jeweils angegebenen Konzentration. Nach Beendigung der Messung wurden das komplette Umströmungssystem sowie dessen Schläuche mit Aqua bidest. gereinigt und mit Stickstoff trocken gepustet.

### **3.3.3.2 Datenauswertung**

Zur Ratio-Bestimmung wurden pro Messwert 2 Bilddateien gespeichert: jeweils eine Datei für 340 nm und die dazugehörige Datei für 380 nm Anregungswellenlänge. Für jede Datei wurden die gesamten Daten der Kurve ausgelesen. Der Vorteil in diesem Programm ist die Auswahl von verschiedenen Regionen, sog. „regions of interest“ (ROI), in den gespeicherten Bildern. Dazu wurde die Pankreasinsel zur Datenauswertung und Erstellung der Kinetik in 6 verschiedene Teilbereiche aufgeteilt, ein ROI wurde zentral, die anderen ROI's wurden im Uhrzeigersinn peripher positioniert (Ravier et al., 2002). Auf diese Weise konnten die Messwerte von Teilbereichen derselben Langerhans'schen Inseln verglichen werden. Nach Ratio-Bildung wurde mit Hilfe des Fucal-Programms die Kinetik jedes einzelnen Experiments bestimmt. Mit Hilfe des Prism-Programms (GraphPad, San Diego, USA) konnte die Fluoreszenz-Ratio der einzelnen ROI's mit der dazugehörigen Kinetik von jeweils einer Pankreasinsel graphisch dargestellt werden (siehe z.B. Resultateteil Kapitel 4.5). Um eine quantitative Aussage machen zu können, wurde zunächst für jedes Experiment der Mittelwert aus den verschiedenen ROI's jeder Langerhans'schen Insel erstellt und danach aus den Mittelwerten der Einzelerperimente (mindestens 3) ein gesamter Mittelwert gebildet. Die in den einzelnen Experimenten zu erkennenden cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen mit unterschiedlicher Stärke waren im Mittelwert deshalb häufig nicht mehr sichtbar.

### 3.4 Mikrofluorimetrische Messung des cytosolischen pH-Wertes in Pankreasinseln der Maus

#### 3.4.1 Medien für mikrofluorimetrische Messungen des cytosolischen pH-Wertes ([pH]<sub>i</sub>)

##### 3.4.1.1 Basismedium

Die Bedingungen sowie die Herstellung des Basismediums (Stammlösungen 1 bis 7) wurden hier durch dieselbe Vorgehensweise, wie unter 3.3.1.1 beschrieben, erfüllt.

Als Basismedium wurde auch ein kompensatorisch Natrium-reduzierter Krebs-Ringer-Puffer verwendet, der bei einem Herstellungsvolumen von 78 ml (siehe Tabelle) schon eine K<sup>+</sup>-Konzentration von 40 mM mit enthielt (siehe dazu auch Resultateteil Kapitel 4.6).

	Volumen (ml)	Endkonzentration
<b>Stammlösung 1 (0,9% NaCl)</b>	42,6	84,1 mM
<b>Stammlösung 2 (1,15% KCl)</b>	19,8	39,1 mM
<b>Stammlösung 3 (1,62% CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O)</b>	1,8	2,5 mM
<b>Stammlösung 4 (2,11% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,6	1,2 mM
<b>Stammlösung 5 (3,82% MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O)</b>	0,6	1,2 mM
<b>Stammlösung 6 (1,3% NaHCO<sub>3</sub>)</b>	10,2	20,1 mM
<b>Stammlösung 7 (154 mM NaOH + 324,5 mM HEPES)</b>	2,4	10,0 mM

Da bei beiden Basismedien auch eine basale Glucosekonzentration von 5 mM verwendet wurde, wurden zusätzlich 77,29 mg von **D-Glucose-Monohydrat** (Fa. Merck, Darmstadt, M<sub>r</sub> = 198,17 g/mol) abgewogen und in dem jeweiligen Basismedium mit einem Volumen von 78 ml gelöst.

##### 3.4.1.2 Stamm- und Inkubationsmedien des verwendeten Fluoreszenz-pH-Indikators

1. **BCECF-AM (Invitrogen, Ltd., Paisley, UK), M<sub>r</sub> = 688,6 g/mol:**

**BCECF-AM-Stammlösung (1mM):** Es wurden 50 µg BCECF-AM in 50 µl wasserfreiem DMSO gelöst und kurz gevortext. Bei einer Lagerung von ≤ -20°C ist diese Lösung 6 Monate haltbar.

2. **BCECF-AM-Inkubationsmedium (1 µM):** Es wurden 2 µl der BCECF-AM-Stammlösung zu 1998 µl Glucose(5 mM)-haltigem KR-Puffer pipettiert.

### 3.4.2 Der Fluoreszenz-pH-Indikator BCECF-AM

Fluoreszenz-pH-Indikatoren sind essentielle Werkzeuge zur Messung von Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes ( $[pH]_i$ ). Um den pH-Wert quantitativ zu ermitteln, ist es unerlässlich einen Indikator mit einem passenden  $pK_a$ -Wert in Bezug auf das zu untersuchende System zu finden. Da der pH-Wert im Cytosol im neutralen Bereich (allgemein zwischen 6,8 bis 7,4) liegt, ist ein fluoreszierender Indikator mit einem  $pK_a$  um etwa 7 für cytosolische pH-Bestimmungen erforderlich. Die am häufigsten verwendeten Fluoreszenzindikatoren für nahezu neutrale pH-Messungen in Zellkulturen sind Fluoresceinderivatisierte Moleküle. Das Fluorescein selbst wird weniger für die Messung des  $[pH]_i$  verwendet, weil es eine hohe „leakage“-Rate für die Quantifizierung des  $[pH]_i$  besitzt. So wurde der mittlerweile am weitesten verbreitete fluoreszierende pH-Indikator, das BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein), von Rink (Rink et al. 1982) vorgestellt. Mit der Einführung 3 weiterer acetylierter Carboxylgruppen, wobei 2 davon über Ethyl-Substituenten verknüpft sind, resultiert daraus ein BCECF-Molekül mit einem  $pK_a$ -Wert von 6,98, welches eine breite Anwendung zur Messung des  $[pH]_i$  findet. Mit seinem  $pK_a$ -Wert ist eine Dual-Anregung des ratiometrischen pH-Indikators ideal für Messungen von Veränderungen von  $\pm 1$  pH-Einheiten um etwa  $pH = 7$ , was dem cytosolischen pH entspricht. Wie oben erwähnt, ist der fluoreszierende pH-Indikator mit Acetoxymethyl-Gruppen (BCECF-AM) verestert, die für die Lipophilie sorgen um durch die Zellmembran der Insel während der Inkubationszeit zu permeieren. Nach transmembranärer Diffusion wird der nicht-fluoreszierende Pentaacetoxymethylester (BCECF-AM) durch zelleigene Esterasen im Cytosol hydrolysiert und so in die fluoreszierende Form, die hydrophile Säure BCECF, überführt, welche cytosolisch selektiv  $H^+$  bindet. BCECF weist bei physiologischem pH-Wert vier bis fünf negative Ladungen auf (siehe **Abbildung 3.7**), was zu einer eingeschränkten Membrangängigkeit führt und somit zu einer Akkumulation im Cytosol beiträgt. Laut Rink (Rink et al. 1982) ist BCECF gleichmäßig verteilt und soll sich auch nicht in den Mitochondrien anreichern.

Zur Exzitation kommen zwei verschiedene monochromatische Wellenlängen (440 und 490 nm) zur Anwendung. In beiden Fällen liegt das Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 535 nm. Der isosbestische Punkt des pH-Indikators, bei dem die Fluoreszenzänderung keine Abhängigkeit von der  $[H^+]_i$  zeigt, liegt bei 440 nm (Rink et al. 1982). Durch

alternierende Anregung des Fluoreszenzindikators mit 440 und 490 nm wurde jeweils die emittierte Fluoreszenz aufgezeichnet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei abhängig vom Exzitationsspektrum der cytosolischen Bindung von BCECF und Wasserstoffionen ( $H^+$ ). Bei einer cytosolischen Azidifizierung bewirkt eine Bindung von  $H^+$ -Ionen an das BCECF-Molekül eine Abnahme der BCECF-Fluoreszenz bei der Exzitationswellenlänge von 490 nm und eine Zunahme der Emission bei der Exzitationswellenlänge von 440 nm. Der Grund dafür ist ein Wechsel vom konjugierten Phenolat-Anion (siehe **Abbildung 3.7, Pentaanion B**) zum konjugierten Phenol (siehe **Abbildung 3.7, Tetranion A**) durch Bindung von  $H^+$ -Ionen an das BCECF-Molekül. Somit nimmt die Elektronendichte im  $\pi$ -System ab. Für die Anregung der  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge wird nun mehr Energie benötigt, d.h. das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu kürzeren Wellenlängen hin (*hypsochrome Verschiebung*), wodurch eine Zunahme der Lichtemission bei der Exzitationswellenlänge von 440 nm verursacht wird. Aus der jeweiligen Emission kann ein Quotient gebildet werden, die Ratio 490/440, die als Maß des cytosolischen pH-Wertes  $[pH]_i$  fungiert. Daraus folgt, dass eine cytosolische Azidifizierung zu einer Abnahme der Ratio 490/440 und eine cytosolische Alkalisierung zu einer Zunahme der Ratio 490/440 führt. Der Ratio-Wert erlaubt Artefakt-bedingte Einflüsse auf die Fluoreszenzmessung von Änderungen des  $[pH]_i$  zu unterscheiden, weil sie das Signal der beiden Wellenlängen meist in gleichgerichteter Weise verändern. Nicht nur  $[pH]_i$ -Änderungen können das Fluoreszenzsignal beeinflussen, sondern auch andere Faktoren, wie die Inseldichte, die Fluoreszenzintensität oder die über die Dauer des Experiments abnehmende BCECF-Konzentration in den Inseln, z.B. durch Transport des Indikators in den extrazellulären Raum oder Ansammlung in Zellkompartimenten (Allen et al. 1990).

Zur Messung des cytosolischen pH-Wertes wird nicht das reine Triacetoxymethylester verwendet (siehe **Abbildung 3.7, Struktur 1**), sondern der Hersteller, in diesem Fall Invitrogen, stellt ein Gemisch aus Lacton-Varianten, **Struktur 2** und **3**, zur Verfügung (siehe **Abbildung 3.7**). Das BCECF-AM von Invitrogen enthält überwiegend eine Mischung aus den Molekülstrukturen 2 und 3 mit einer typischen prozentualen Zusammensetzung im Verhältnis von 45:55, wobei durch Hydrolyse immer die freie Säure BCECF entsteht.

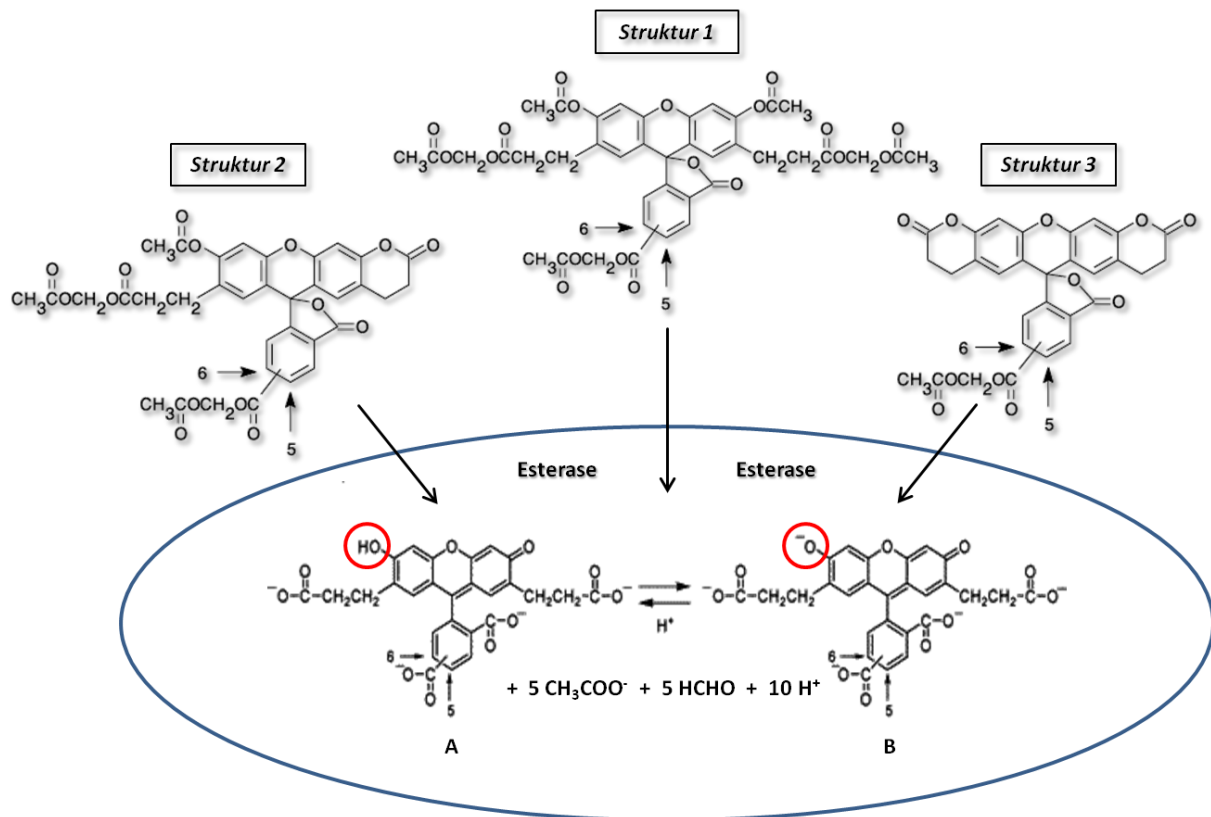


Abbildung 3.7 Molekülstrukturen von BCECF-AM und Schema einer Inselbeladung mit BCECF-AM modifiziert nach Boens (Boens et al. 2006)

### 3.4.2.1 Die Beladung mit BCECF

Auch hierbei spielt die Konzentration des Fluoreszenzindikators eine entscheidende Rolle. Ist sie zu niedrig, so ist ein geringes Fluoreszenzsignal die Folge. Ist sie zu hoch, besteht ein möglicher Signalverlust durch Bindung des freien BCECF-Moleküls an andere Kationen oder eine Anreicherung in Zellkompartimenten. Außerdem sei darauf hingewiesen, dass ein zusätzlicher Faktor im Sinne eines Intensitätsverlustes, v.a. durch einen Transport des Indikators in den Extrazellularraum möglich ist. Diese Fluoreszenzabnahme beruht offenbar auf einem aktiven, ATP-abhängigen Transportmechanismus für das BCECF aus der Zelle heraus (Allen et al. 1990). Nach einer Kultivierungsdauer von mindestens 72 h erfolgte die Beladung der Langerhans'schen Inseln direkt vor dem geplanten Experiment. Die Pankreasinseln wurden 40 Minuten mit BCECF-AM-Inkubationsmedium (1  $\mu$ M) bei 37°C sowie unter permanenter Carbogen-Begasung abgedunkelt beladen.

Für die Beladung und Verwendung im Experiment eigneten sich rundliche Pankreasinseln mit kleinem Durchmesser, die weitestgehend in der Mitte des Deckgläschens fest angewachsen und frei von exokrinem Gewebe waren (Gilon et al. 1994; Ravier et al. 2002).

### **3.4.3 Messung des cytosolischen pH-Wertes**

Für die Messung wurde derselbe Messplatz, wie unter 3.3.3 beschrieben, verwendet und das Experiment wurde, wie unter 3.3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Hierbei musste lediglich ein anderer Filterwürfel im Ploemopak-Modul in den Strahlengang gebracht werden. Der verwendete Filterwürfel hatte als Excitationsfilter einen Bandpassfilter von 440-490 nm, einen dichroitischen Filter mit der Halbwertzahl 510 nm und als Emissionsfilter einen Langpassfilter mit 515 nm.



### 3.5 Stammlösungen und Versuchslösungen

Die Testmedien wurden aus Stammlösungen der jeweiligen zu untersuchenden Substanz durch Verdünnen mit Extrazellulärer Lösung (3.2.1.1) für Patch-Clamp-Versuche und durch Verdünnen mit Glucose-haltigem Krebs-Ringer-Puffer (3.3.1.1) für mikrofluorimetrische Messungen gewonnen. Die hergestellten Stammlösungen wurden bei 2 bis 8°C gelagert und höchstens 6 Wochen lang verwendet. Musste zur Herstellung der Stammlösung DMSO verwendet werden, sollte die Endkonzentration von DMSO in den Testmedien nicht größer als 0,5% sein um Eigeneffekte des DMSO auszuschließen.

**BAY K8644 (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis),  $M_r = 356,30$  g/mol:** Bay K8644-Stammlösung (2 mM): 712,6 mg wurden in 1 ml DMSO gelöst; Bay K8644-Versuchslösung (1  $\mu$ M): Zur Verdünnung von 1:2000 wurden 25  $\mu$ l Bay K8644-Stammlösung ad 50 ml Extrazelluläre-Lösung pipettiert. Licht- und luftgeschützte Lagerung bei 4°C ist erforderlich, weil Bay K8644 photolabil und oxidationsempfindlich ist.

**(+)-Efaroxan, (-)-Efaroxan (Fa. Axon Medchem., Groningen, Niederlande),  $M_r = 216,3$  g/mol:** Es handelt sich hierbei um die freien Säuren. (+)/(-)-Efaroxan-Stammlösung (20 mM): 4,326 mg (+)/(-)-Efaroxan wurden in 1 ml DMSO gelöst; (+)/(-)-Efaroxan-Versuchslösung (100  $\mu$ M): 200  $\mu$ l (+)/(-)-Efaroxan-Stammlösung wurden ad 20 ml eines Glucose-haltige KR-Puffer oder Extrazelluläre-Lösung pipettiert. Versuchslösungen wurden bei 4°C gelagert.

**Glipizid (Fa. Pfizer, Karlsruhe),  $M_r = 445,53$  g/mol:** Glipizid-Stammlösung (5,41 mM): 2,41 mg wurden in 1 ml NaOH 50 mM (0,05 N) gelöst; Glipizid-Versuchslösung (2,7  $\mu$ M): Zur Verdünnung der Glipizid-Stammlösung von 1:2000 wurden 25  $\mu$ l Glipizid-Stammlösung ad 50 ml Extrazelluläre-Lösung pipettiert. Versuchslösung wurde bei 4°C gelagert.

**Nifedipin (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis),  $M_r = 346,33$  g/mol:** Nifedipin-Stammlösung (10 mM): 3,463 mg wurden in 1 ml in DMSO gelöst; Nifedipin-Versuchslösung (10  $\mu$ M): Zur Verdünnung der Nifedipin-Stammlösung von 1:1000 wurden 50  $\mu$ l Nifedipin-Stammlösung ad 50 ml Extrazelluläre-Lösung pipettiert. Licht- und luftgeschützte Lagerung bei 4°C erforderlich, weil Nifedipin photolabil und oxidationsempfindlich ist.

**TEA (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis),  $M_r = 165,70$  g/mol:** TEA-Stammlösung (1 mM): 165,7 mg wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst; TEA-Versuchslösung (10 mM): Zur Verdünnung der TEA-

Stammlösung von 1:100 wurden 500 µl TEA-Stammlösung ad 50 ml Extrazelluläre-Lösung pipettiert. Versuchslösung wurde bei 4°C gelagert.

**Tolbutamid (Fa. Serva, Heidelberg),  $M_r = 270,30$  g/mol:** Tolbutamid-Stammlösung (50 mM): 13,515 mg Tolbutamid wurden in 1 ml 0,1 M NaOH gelöst; Tolbutamid-Versuchslösung (500 µM): 100 µl Tolbutamid-Stammlösung wurden ad 10 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers oder 500 µl Tolbutamid-Stammlösung ad 50 ml Extrazelluläre-Lösung pipettiert. Versuchslösung wurde bei 4°C gelagert.

**Cobalt(II)-chlorid x 6 H<sub>2</sub>O (Fa. Sigma Aldrich, St. Louis),  $M_r = 237,93$  g/mol:** 2,5 mM Versuchslösung: 0,595 mg wurden in 1 ml Extrazelluläre-Lösung gelöst, d.h. für 50 ml EZ wurden 29,74 mg CoCl<sub>2</sub> verwendet.

**Kaliumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt),  $M_r = 74,96$  g/mol**

Für Patch-Clamp-Versuche wurde wie folgt vorgegangen:

Aus einer 3 M KCl Lösung wurden

für 15 mM KCl 156,6 µl;

für 22,5 mM KCl 281,6 µl;

für 31,5 mM KCl 431,6 µl;

für 40 mM KCl 573,3 µl

entnommen und jeweils ad 50 ml EZ pipettiert.

Für mikrofluorimetrische Messungen wurden

für 15 mM 6,78 mg KCl;

für 40 mM 25,42 mg KCl

abgewogen und jeweils in 10 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers gelöst.

**D-Glucose-Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt),  $M_r = 198,17$  g/mol**

Für Patch-Clamp-Experimente wurden für eine 10 mM Glucose-Lösung 990,9 mg Glucose in 500 ml glucosefreier EZ (3.2.1.1) gelöst.

### Isoosmotische EZ

Um bei der Durchführung der Patch-Clamp-Versuche eine Isotonie der Extrazelluläre-Lösung zu gewährleisten, wurde auf Grundlage der Rezeptur für die EZ (siehe auch 3.2.1.1) der Anteil an Natriumchlorid auf 105,6 mM verringert und der Anteil an Kaliumchlorid auf 40 mM erhöht (siehe Resultateteil, Kapitel 4.3).

Für ein Endvolumen von einem Liter isoosmotischer EZ wurden

Einwaage	Substanz	Molarität
6,17 g	NaCl (Fa. AppliChem, Darmstadt, $M_r = 58,44 \text{ g/mol}$ )	105,6 mM
2,98 g	KCl (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 74,56 \text{ g/mol}$ )	40 mM
244,0 mg	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 203,30 \text{ g/mol}$ )	1,2 mM
382,3 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 147,02 \text{ g/mol}$ )	2,6 mM
2,383 g	HEPES (Fa. Roth, Karlsruhe, $M_r = 238,31 \text{ g/mol}$ )	10 mM
0,991 g	D-Glucose x H <sub>2</sub> O (Fa. Merck, Darmstadt, $M_r = 198,17 \text{ g/mol}$ )	5 mM

eingewogen, in Aqua bidest. gelöst und mit 1N NaOH ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Für eine isoosmotische EZ mit 10 mM Glucose wurden 1,982 g eingewogen.

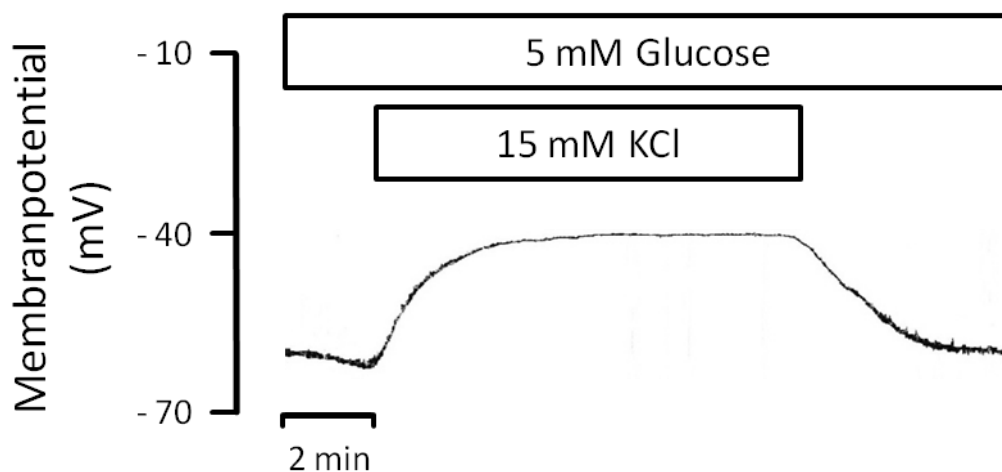
### 3.6 Statistik

Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe der Graphpad Prism4 Software kalkuliert und diese sind jeweils als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM für N unabhängige Experimente angegeben. Signifikanzen wurden unter Verwendung des ungepaarten t-Tests berechnet, wobei  $p < 0,05$  als signifikant gewertet wurde.

## 4 Resultate

### 4.1 Versuche zum Verhältnis von Aktionspotential zum Plateaupotential

Die Depolarisation der Zellmembran wurde an kultivierten intakten Beta-Zellen der Maus mit der perforated-patch Konfiguration der Patch-Clamp-Technik registriert. Nach Erreichen eines stabilen Ruhemembranpotentials von  $-63,60 \pm 1,46$  mV ( $n = 4$ ) wurden die Beta-Zellen mit 15 mM KCl umspült (siehe **Abbildung 4.1**). Nach 2 bis 3 Minuten stellte sich ein Depolarisationsplateau ein mit einem Plasmamembranpotential von  $-43,23 \pm 2,29$  mV ( $n = 4$ ). Daraus folgt, dass 15 mM KCl eine Depolarisation von  $-20,37 \pm 2,71$  mV ( $n = 4$ ) induziert und sich ein Gleichgewichtspotential bei -40 mV einstellt.

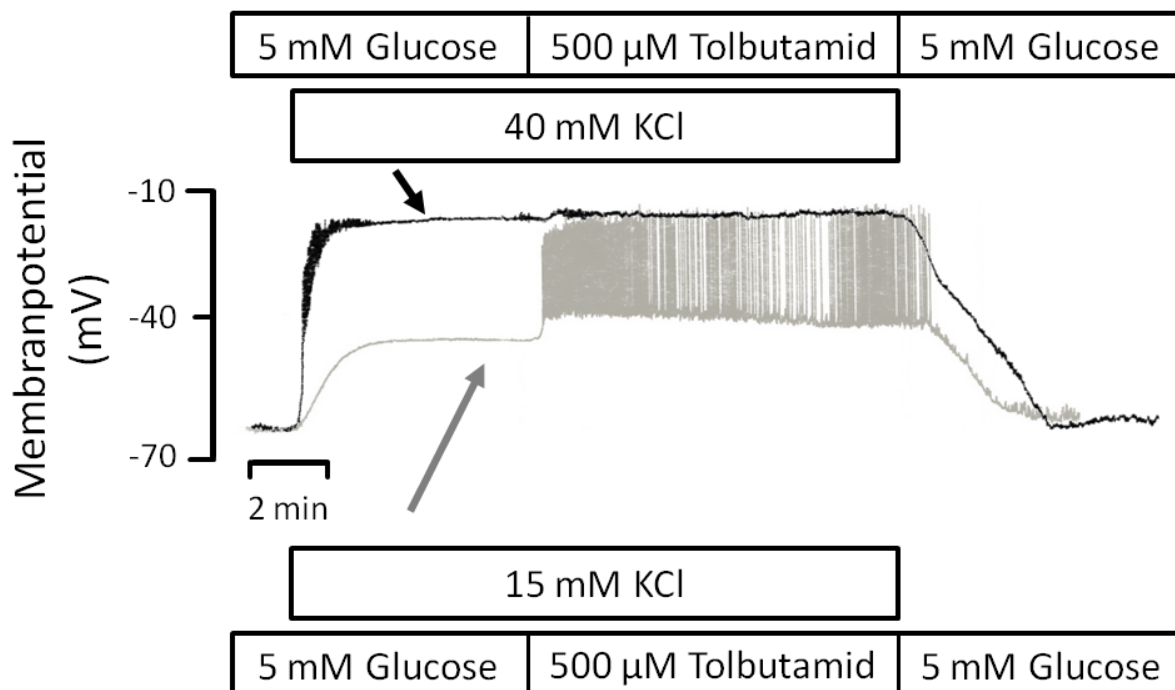


**Abbildung 4.1** Ausmaß der Depolarisation durch 15 mM KCl an einer Beta-Zellmembran

Durch 15 mM KCl induzierte Depolarisation der Plasmamembran einer Beta-Zelle in der perforated-patch Konfiguration. Nach Stabilisierung des Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen mit 15 mM KCl umspült. Nach Erreichen eines dauerhaften Depolarisationsplateaus durch 15 mM KCl wurde anschließend KCl ausgewaschen. Originalregistrierung repräsentativ für 4 Versuche.

Das Plateau, welches durch eine 15 mM KCl Depolarisation entsteht, entspricht größenordnungsgemäß ungefähr dem Plateau wie bei einem  $K_{ATP}$ -Kanalblock (Hatlapatka et al. 2009). Es sind keine Aktionspotentiale sichtbar, weil für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom ein kompensatorischer Kaliumefflux möglich ist. Also sollte die zusätzliche Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle Aktionspotentiale sichtbar machen. Wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von 15 mM KCl zusätzlich ein Sulfonylharnstoff, wie das Tolbutamid mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 500  $\mu$ M verwendet (Ashcroft und Gribble 1999), werden Aktionspotentiale über das durch 15 mM KCl induzierte Depolarisationsplateau hinaus

sichtbar (siehe **Abbildung 4.2, graue Registrierung**). Deswegen wurden jeweils ein Wert für das Depolarisationsplateau und ein Wert für die Spitze der Aktionspotentiale ermittelt. Ein Plateau-Wert gibt die Schwelle an von der die Aktionspotentiale starten und ein Spitzenwert gibt das maximale Ausmaß der Aktionspotentiale an. Ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-63,86 \pm 0,75$  mV ( $n = 5$ ) depolarisierten 15 mM KCl innerhalb von 2 bis 3 Minuten das Plasmamembranpotential auf einem Plateauwert von  $-44,48 \pm 0,65$  mV ( $n = 5$ ), was eine Depolarisation von  $-19,38 \pm 0,99$  mV ( $n = 5$ ) ergibt. Das entspricht den Ergebnissen in Abbildung 4.1. Die zusätzliche Anwesenheit von 500  $\mu$ M Tolbutamid bewirkten eine weitere Steigerung des Depolarisationsplateaus um  $+6,93 \pm 1,17$  mV ( $n = 5$ ) auf  $-37,55 \pm 0,97$  mV ( $n = 5$ ). Auf diesem Depolarisationsplateau sind Aktionspotentiale aufgesetzt, die einen Spitzenwert von  $-17,89 \pm 1,16$  mV ( $n = 5$ ) erreichten.



**Abbildung 4.2** Depolarisation durch 15 mM KCl sowie 40 mM KCl bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tolbutamid

Durch 15 mM (graue Registrierung) oder 40 mM KCl (schwarze Registrierung) induzierte Depolarisation der Plasmamembran einer Beta-Zelle in der perforated-patch Konfiguration. Nach Stabilisierung des Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen mit 15 mM oder 40 mM KCl umspült. Nach Erreichen eines dauerhaften Depolarisationsplateaus durch 15 mM oder 40 mM KCl wurde der Sulfonylharnstoff Tolbutamid zusätzlich hinzugeben und im Anschluss KCl mit Tolbutamid ausgewaschen. Originalregistrierungen repräsentativ für 4 bis 5 Versuche.

Mit Auswaschen des verwendeten Sulfonylharnstoffs durch EZ-Lösung kommt es nach kurzer Zeit zum Verlust der Aktivität der Aktionspotentiale bis zur vollständigen Regenerierung des Ruhemembranpotentials von  $-65,33 \pm 1,64$  mV ( $n = 5$ ).

Wird im Vergleich die Plasmamembran ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-66,11 \pm 1,28$  mV ( $n = 4$ ) mit 40 mM KCl depolarisiert (siehe **Abbildung 4.2, schwarze Registrierung**), resultiert daraus eine Potentialänderung von  $40,44 \pm 1,84$  mV ( $n = 4$ ) und erreicht ein Depolarisationsplateau von  $-25,67 \pm 1,26$  mV ( $n = 4$ ). Die Zugabe von 500  $\mu$ M Tolbutamid bewirkte eine marginale Steigerung des durch 40 mM KCl induzierte Depolarisationsniveau um  $+3,14 \pm 1,40$  mV ( $n = 4$ ) bis auf ein stabiles Membranpotentialplateau von  $-22,53 \pm 0,78$  mV ( $n = 4$ ). Auch hier bewirkte das Auswaschen mit EZ-Lösung eine Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials von  $-65,88 \pm 0,95$  mV ( $n = 4$ ). Das heißt, die Verwendung von 15 mM KCl erzeugt eine Depolarisationsstärke, der einem Depolarisationsplateau durch einen Sulfonylharnstoff-abhängigen  $K_{ATP}$ -Kanal-Schluss nahe kommt, wobei durch 40 mM KCl eine Depolarisation induziert wurde, die den Spitzenwerten der Aktionspotentialspikes entsprach (Hatlapatka et al. 2009). Die Anwesenheit von 40 mM KCl bewirkt einen Verlust des Aktionspotentialmusters wie es eigentlich von Tolbutamid hervorgerufen wird.

Anschaulicher wird dieser Verlust in dem nächsten Experiment (siehe **Abbildung 4.3**), wobei durch stufenweise Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration bei gleichzeitiger Anwesenheit von 500  $\mu$ M Tolbutamid die Aktionspotentialamplituden schrumpfen. Die Zugabe von 500  $\mu$ M Tolbutamid zum extrazellulären Medium mit 15 mM KCl induzierte Aktionspotentiale, die dem durch 15 mM KCl entstandenen Depolarisationsplateau überlagert waren. Beim schrittweisen Anheben der  $K^+$ -Konzentration auf 40 mM bei kontinuierlicher Anwesenheit von Tolbutamid verminderten sich die Aktionspotentialamplituden bei gleichzeitiger Erhöhung des Depolarisationsplateaus. Schließlich waren keine Aktionspotentiale in der kombinierten Gegenwart von Tolbutamid und 40 mM KCl vorhanden. Interessanterweise wird die Depolarisation schrittweise mit jeder  $K^+$ -Konzentration stärker als es nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung zu erwarten war (siehe **Abbildung 4.3**). Es stellt sich somit die Frage, ob sich bei der Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration ein zusätzlicher depolarisierender Effekt ergibt.

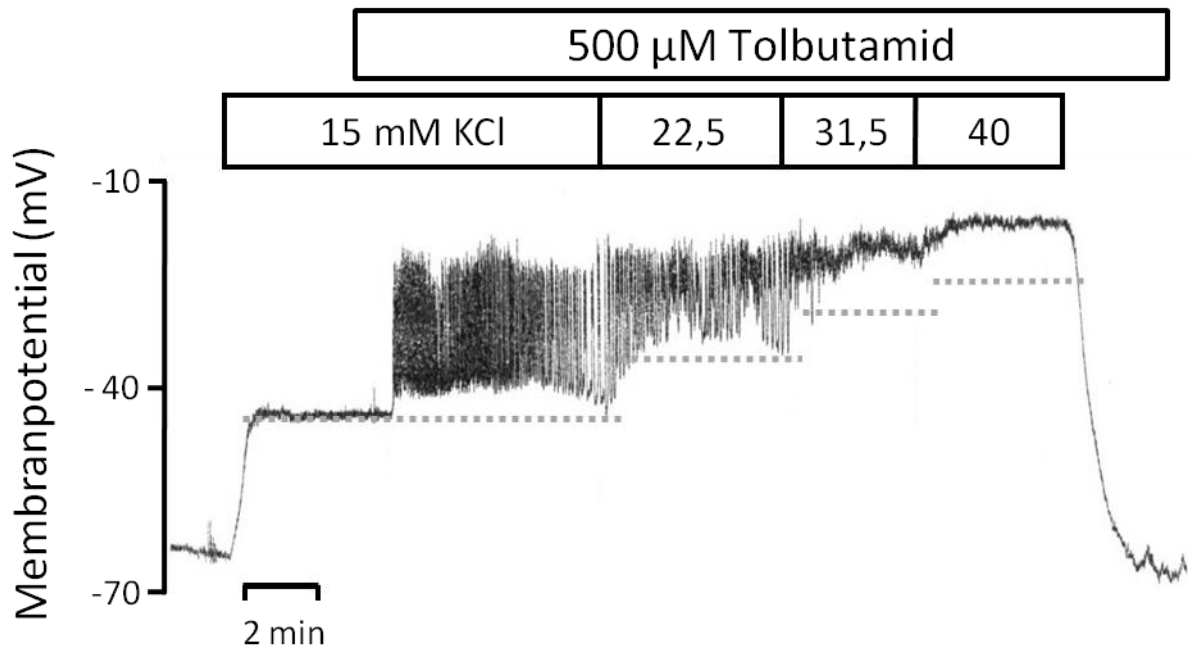
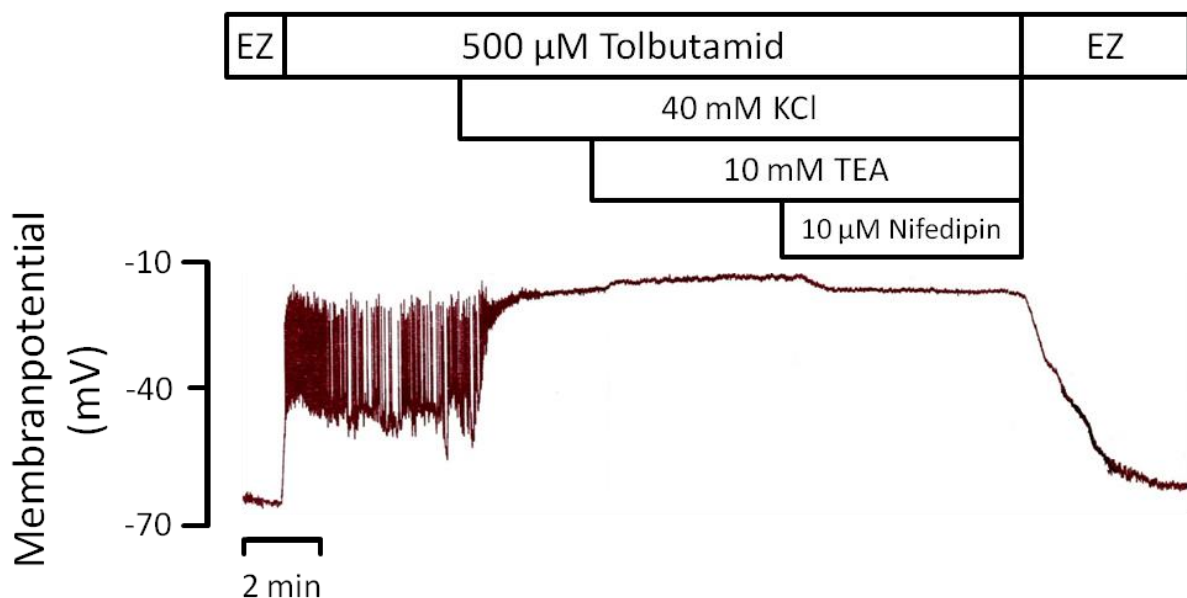


Abbildung 4.3 Transformation der Aktionspotentiale in einer Beta-Zelle durch stufenweise Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration in Gegenwart von 500  $\mu M$  Tolbutamid

Die zusätzliche Anwesenheit von 500  $\mu M$  Tolbutamid zu 15 mM KCl erzeugt Aktionspotentiale, wobei deren Amplituden mit zunehmender KCl-Konzentration sich verringern und bei Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  nicht mehr vorhanden sind. Die gepunkteten grauen Linien zeigen das theoretische Membranpotential für die jeweils eingesetzte  $K^+$ -Konzentration, die mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet wurde. Originalregistrierung ist repräsentativ für 4 Versuche.

Nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (bei 23°C) hätte die Depolarisation durch Erhöhung von 5,6 auf 15 mM  $K^+$  18,3 mV betragen müssen, durch Erhöhung von 15 auf 22,5 mM  $K^+$  8,7 mV, durch Erhöhung von 22,5 auf 31,5 mM  $K^+$  7,6 mV und von 31,5 auf 40 mM 5,6 mV.

In einem weiteren Versuch sollte mit einem zusätzlichen pharmakologischen Werkzeug geprüft werden, ob sich auch in Gegenwart von 40 mM  $K^+$  Aktionspotentiale generieren lassen. (Hierbei wurde ein Nervengift verwendet, das schon seit den 70iger Jahren in der Neurophysiologie eingesetzt wird.) Hierfür wurde das Tetraethylammonium-Kation (TEA) verwendet. Das TEA blockiert spannungsaktivierte Kaliumkanäle, deren Öffnung die Repolarisation des Membranpotentials nach einem Aktionspotential bewirkt. Die Konsequenz sollte eine Zunahme der Aktionspotential-Amplitude und der Aktionspotential-Dauer sein. Wurde in der perforated-patch Konfiguration bei Beta-Zellen ein Ruhemembranpotentialniveau erreicht ( $-61,57 \pm 0,5$  mV;  $n = 4$ ), reagierten die Zellen unter Einfluss auf 500  $\mu$ M Tolbutamid mit dem typischen Aktionspotential-Muster (Amplitudenmaximum bei  $-20,04 \pm 2,8$  mV,  $n = 4$ ) ausgehend von einem stabilen Plateau.



**Abbildung 4.4** Depolarisierende Wirkung des Beta-Zell-Plasmamembranpotentials in gleichzeitiger Anwesenheit von 500  $\mu$ M Tolbutamid, 40 mM  $K^+$  und 10 mM TEA sowie repolarisierender Effekt durch 10  $\mu$ M Nifedipin.

Nach Erreichen des Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen sukzessiv mit 500  $\mu$ M Tolbutamid, 40 mM  $K^+$ , 10 mM TEA und 10  $\mu$ M Nifedipin perfundiert. Ein Wash-out dieser Pharmakas bewirkte eine Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials. Originalregistrierung ist repräsentativ für 4 Versuche.

Eine zusätzliche Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  erzeugte einen Verlust der Aktionspotentiale unter Ausbildung eines Plateaus bei  $-15,2 \pm 1,5$  mV ( $n = 4$ ), welches über das durch Tolbutamid induzierte maximale Aktionspotential-Spitzenniveau hinaus geht. Daraus resultiert eine Differenz von  $4,8 \pm 2,8$  mV ( $n = 4$ ) (siehe **Abbildung 4.4**). Die Zugabe von TEA bei gleichzeitiger Anwesenheit von 500  $\mu$ M Tolbutamid und 40 mM  $K^+$  erhöhte das

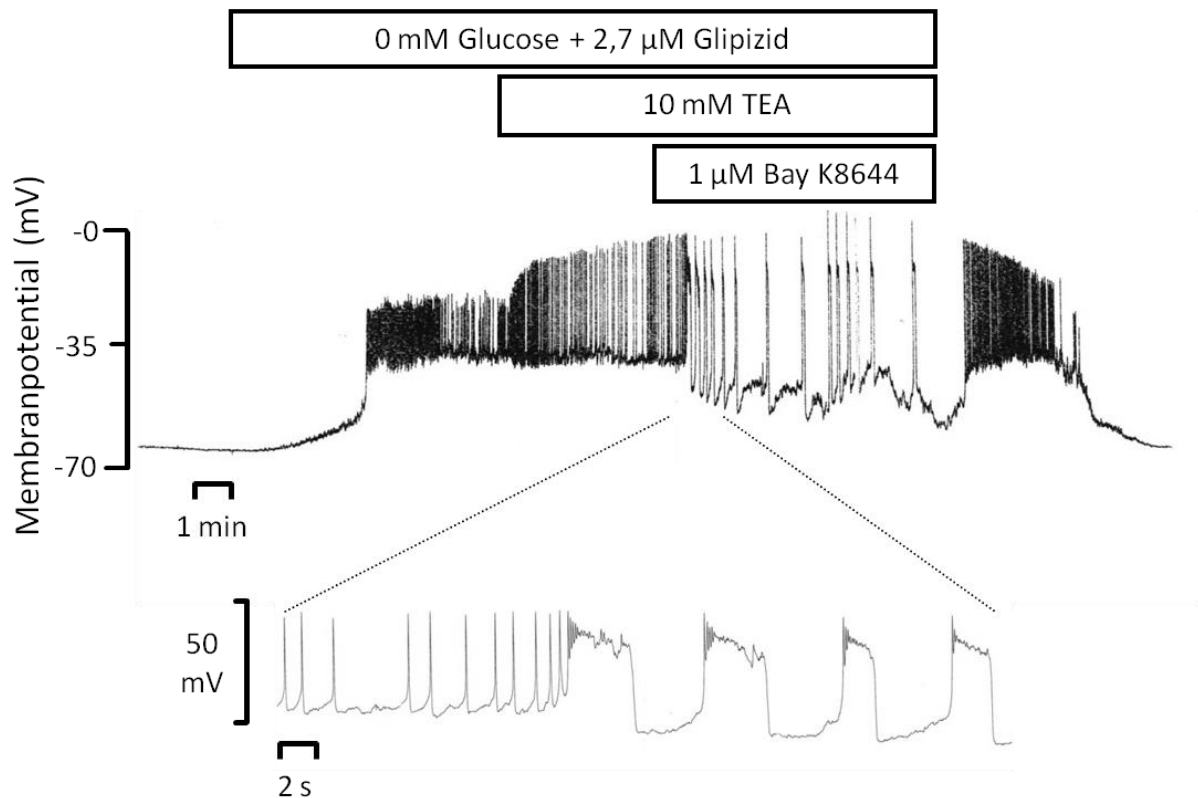


Depolarisationsniveau um  $+1,9 \pm 2,3$  mV ( $n = 4$ ) und ist nicht signifikant ( $p = 0,4366$ , t-Test). Das heißt, auch durch TEA waren Aktionspotentiale nicht zu generieren. Es scheint also ein kompensatorischer Kaliumefflux als Ursache des Plateaus unwahrscheinlich.

Der zusätzliche Einsatz von Nifedipin, einem selektiven L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker, sollte nun den Beitrag des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über L-Typ Kanäle präsentieren, da nämlich das Membranpotential durch die Blockade partiell repolarisiert (siehe **Abbildung 4.4**). Das Membranpotential sank durch die Nifedipin-Wirkung um  $-3,6 \pm 3,1$  mV auf  $-16,8 \pm 2,5$  mV ( $n = 4$ ). Ein Auswaschen aller eingesetzten Pharmaka bewirkte eine Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials auf  $-60,7 \pm 1,3$  mV ( $n = 4$ ).

Die darauffolgenden Versuche wurden durchgeführt, um vor allem die Aktionspotentialdauer zu variieren. Dabei kam zum Einem eine Kombination aus verschiedene Pharmaka zum Einsatz (siehe **Abbildung 4.5**) und zum Anderem wurde im extrazellulärem Medium die Calciumkonzentration halbiert (1,3 mM) oder verdoppelt (5,2 mM) (siehe **Abbildung 4.6**).

Wenn einer Kombination aus 2,7  $\mu\text{M}$  Glipizid (Sulfonylharnstoff in maximal wirksamer Konzentration hinsichtlich des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals-Schlusses) und 10 mM TEA der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Öffner, Bay K8644, hinzugefügt wurde, entstand eine drastische Verlängerung des Aktionspotentials ( $> 2$  s), wobei nach jedem Aktionspotential eine Unterschreitung der Repolarisation gefolgt war, die eine elektrische Aktivität verhinderte bis sich wieder das nächste deformierte Aktionspotential entwickelte. Bei genauerem Hinsehen besteht der erste Teil des verformten Aktionspotentials aus einer schnellen Abfolge von Aktionspotentialen mit einem fortschreitenden Verlust der Repolarisation begleitet von einer Abnahme der Aktionspotentialamplitude (siehe **Abbildung 4.5**, untere Registrierung).



**Abbildung 4.5** Auswirkungen der Aktionspotentialamplitude und -dauer durch eine kombinierte Wirkung von Glipizid, TEA und Bay K8644

Beeinflussung des Membranpotentials durch eine Wirkstoffkombination aus 2,7 μM Glipizid, 10 mM TEA und zusätzlich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Öffners, 1 μM Bay K8644, auf das Aktionspotential an einer Beta-Zelle in der perforated-patch Konfiguration. Durch Applikation von TEA stieg gegenüber Glipizid die Aktionspotentialamplitude an. Die zusätzliche Anwesenheit von 1 μM Bay K8644 erhöhte stark die Aktionspotentialdauer gefolgt von einer Unterschreitung der Repolarisation sowie einer starken Reduzierung der Aktionspotential-Frequenz (siehe untere Aufnahme). Originalregistrierung ist repräsentativ für 5 Versuche.

Eine Veränderung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (siehe **Abbildung 4.6**) führte hingegen zu weniger exakt quantifizierbaren Änderungen in der Gestalt der Aktionspotentiale. Als grundsätzliche Regel lässt festhalten, dass bei subphysiologischen extrazellulären Konzentrationen die Aktionspotentialdauer vermindert ist und bei supraphysiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind die Aktionspotentiale hingegen verbreitert und abgeflacht.

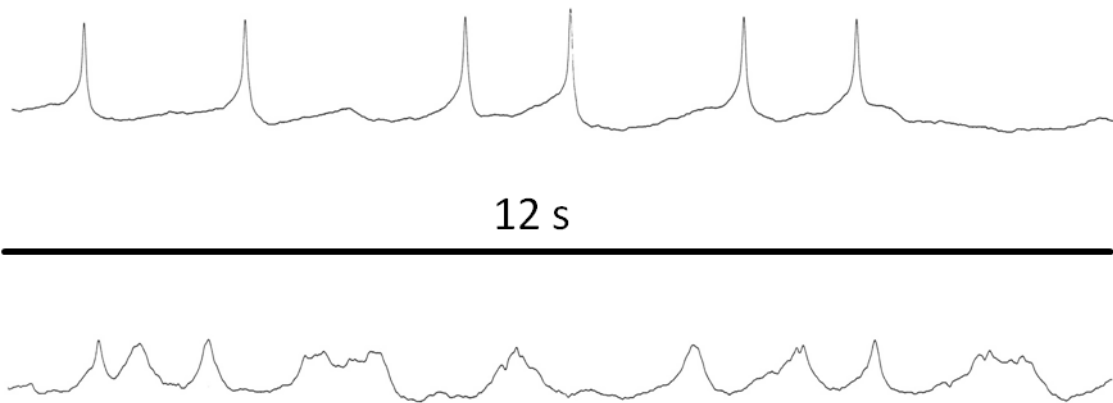


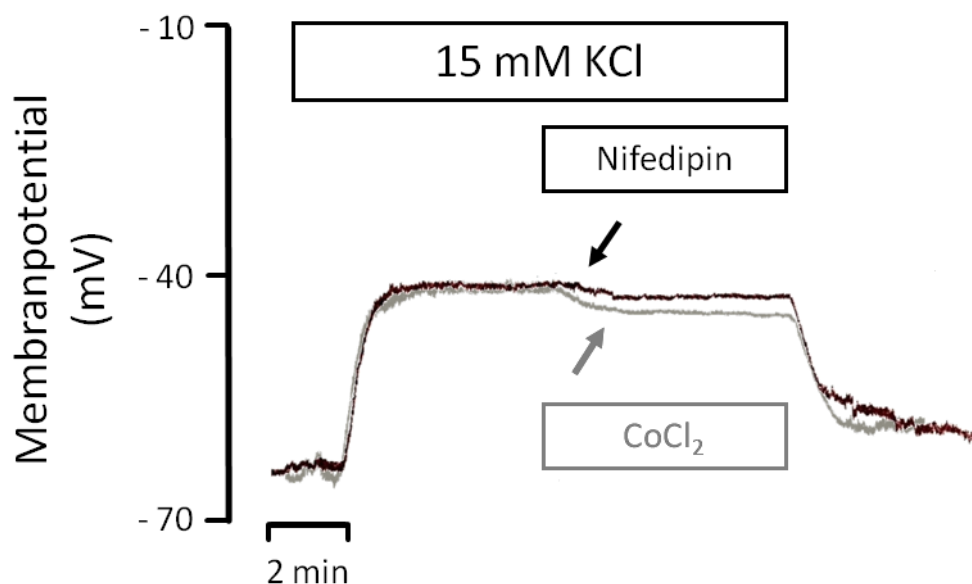
Abbildung 4.6 Gestalt von Aktionspotentiale bei sub- und supraphysiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen

#### 4.2 Unterschied in den Mechanismen des Calciums-Anstiegs durch 15 und 40 mM Kaliumchlorid

In metabolisch intakten Beta-Zellen wurde der repolarisierende Effekt durch einen selektiven sowie unselektiven Calcium-Kanalblocker bei gleichzeitiger Anwesenheit von 15 oder 40 mM KCl unter Anwendung der perforated-patch Konfiguration gemessen sowie die Wirkung beider  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker auf die Depolarisations-induzierten Einwärtsströme.

Ausgangspunkt: Der Grund für diese Untersuchung war die Beobachtung, dass 40 mM KCl eine praktisch maximale stärkere Sekretionsantwort bewirken, wohingegen die Depolarisation durch 15 mM KCl fast ohne Effekt auf die Insulinsekretion bleibt. Da aber in beiden Fällen der Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch einen Depolarisations-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die Plasmamembran zustande gekommen sein musste, so war die Hypothese zu testen, ob sich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch 40 mM KCl von dem durch 15 mM KCl nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ unterscheidet. Da häufig der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal mit der Sekretionsauslösung in Zusammenhang gebracht wird, sollte für beide Kaliumkonzentrationen bestimmt werden, wie viel  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über L-Typ Kanäle vom gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom repräsentiert und ob das Ausmaß des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über den L-Typ Kanal unterschiedlich ist. Als möglichst genereller Parameter wurde die Repolarisation durch Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gemessen. Als Inhibitoren im Zellbad fungierten 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin, um selektiv den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch L-Typ Kanäle zu hemmen oder 2,5 mM Cobalt(II)-chlorid,  $\text{CoCl}_2$ , um den gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu blockieren.

In Gegenwart von 5 mM Glucose depolarisierten 15 mM KCl die Zellmembran durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-63,54 \pm 1,48$  mV auf einen Plateauwert von  $-42,53 \pm 1,24$  mV ( $n = 4$ ). Das durch 15 mM KCl entstandene Membranpotentialplateau wurde bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin um  $1,17 \pm 0,18$  mV (siehe **Abbildung 4.7, schwarze Registrierung**) reduziert. Im Vergleich dazu wurde ein durch 15 mM KCl induziertes Membranpotentialplateau von  $-39,92 \pm 0,38$  mV ( $n = 4$ ) durch 2,5 mM  $\text{CoCl}_2$  um  $+2,92 \pm 0,38$  mV reduziert (siehe **Abbildung 4.7, graue Registrierung**). Dabei zeigt die repolarisierende Wirkung zwischen beiden Inhibitoren einen signifikanten Unterschied ( $p = 0.014$ , t-Test). Zur besseren Darstellung dieser Differenz siehe **Abbildung 4.9**.

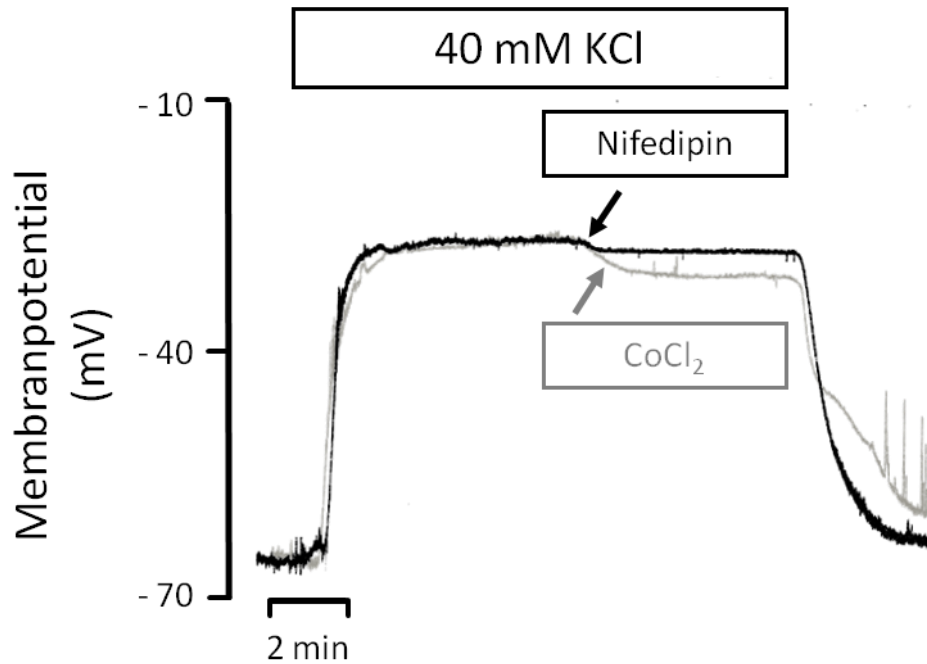


**Abbildung 4.7** Repolarisation durch Nifedipin oder Cobaltchlorid bei gleichzeitiger Anwesenheit von 15 mM KCl

Das durch 15 mM KCl induzierte Membranpotentialplateau repolarisierte schwach, aber reproduzierbar durch den Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin (schwarze Registrierung) oder 2,5 mM  $\text{CoCl}_2$  (graue Registrierung). Das Ausmaß der Repolarisation entspricht der Hemmung des depolarisierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Originalregistrierungen repräsentativ für je 4 Versuche.

In Gegenwart von 40 mM KCl depolarisierte die Zellmembran ausgehend von einem Ruhemembranpotential von  $-62,44 \pm 2,37$  mV ( $n = 4$ ) auf einen Plateauwert von  $-22,35 \pm 2,48$  mV ( $n = 4$ ). Die durch 40 mM KCl induzierte Depolarisation wurde bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin um  $1,50 \pm 0,39$  mV ( $n = 4$ ) (siehe **Abbildung 4.8, schwarze Registrierung**) reduziert. Im Vergleich dazu wurde das durch 40 mM KCl depolarisierte

Membranpotentialplateau von  $-22,06 \pm 1,17$  mV ( $n = 3$ ) durch 2,5 mM  $\text{CoCl}_2$  um  $+6,09 \pm 1,06$  mV ( $n = 3$ ) reduziert (siehe **Abbildung 4.8, graue Registrierung**). Dabei war der Unterschied zwischen der repolarisierenden Wirkung der beiden Inhibitoren ausgeprägter ( $p = 0,006$ , t-Test) verglichen mit der durch 15 mM KCl induzierten Depolarisation. Zur besseren Darstellung dieser Differenz siehe **Abbildung 4.9**.



**Abbildung 4.8** Repolarisation durch Nifedipin oder Cobaltchlorid bei gleichzeitiger Anwesenheit von 40 mM KCl

Das durch 40 mM KCl depolarisierte Membranpotentialplateau repolarisierte schwach, aber reproduzierbar durch den Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin (schwarze Registrierung) oder 2,5 mM  $\text{CoCl}_2$  (graue Registrierung). Das Ausmaß der Repolarisation entspricht der Hemmung des depolarisierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Originalregistrierungen repräsentativ für je 4 Versuche.

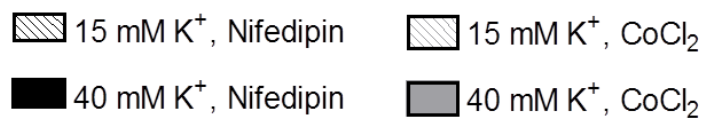
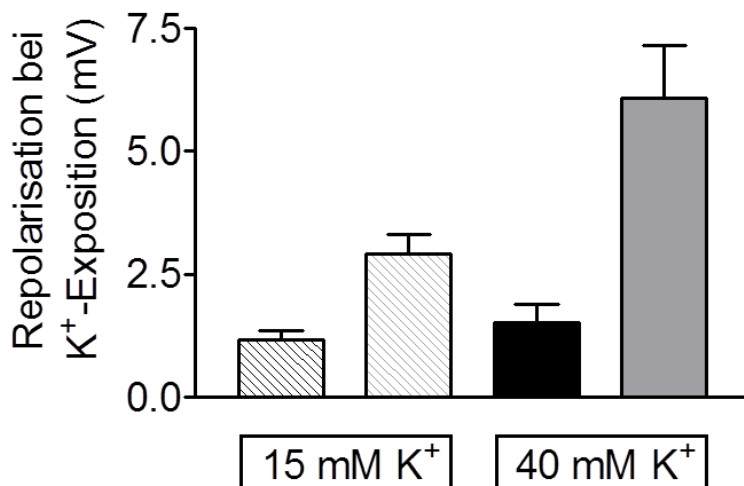


Abbildung 4.9

Vergleich des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms durch 15 und 40 mM K<sup>+</sup> dargestellt als repolarisierende Wirkung der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blockade. Das durch 15 oder 40 mM KCl depolarisierte Membranpotentialplateau repolarisierte schwach, aber reproduzierbar durch die Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms mittels 10 µM Nifedipin oder 2,5 mM CoCl<sub>2</sub>. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von je 4 Versuchen.



Nun wurde die Wirkung von Nifedipin und CoCl<sub>2</sub> auf Depolarisations-induzierte Einwärtsströme gemessen (siehe **Abbildung 4.10**). Dafür wurden 10 mM vom unspezifischen K<sup>+</sup>-Kanalblocker TEA zum K<sub>ATP</sub>-Kanalblocker Glipizid (2,7 µM) hinzugefügt, um die gesamte K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit zu hemmen und dadurch die Ca<sup>2+</sup>-Einwärtsströme darstellbar zu machen. Dabei wurden bei einem Kommando-(Halte)potential von -50 mV nach innen gerichtete Ströme (Ausschläge nach unten) in Reaktion auf depolarisierende Schritte von 10 mV sichtbar (siehe **Abbildung 4.10**; Abschnitt 2). Dieser Einwärtsstrom beträgt  $60,73 \pm 5,88$  pA ( $n = 6$ ). Bei Erhöhung des Haltepotentials von -50 auf -40 mV sinkt der Spitzenstrom auf  $52,23 \pm 3,25$  pA ( $n = 6$ ) in Reaktion auf den 10 mV Depolarisationsschritt leicht und zusätzlich tritt eine hochfrequentierte spontane Aktivität der Einwärtsströme auf (siehe **Abbildung 4.10**; Abschnitt 3). Bei einer weiteren Erhöhung des Haltepotentials von -40 auf -30 mV fällt die Spitzenstromamplitude weiter auf  $32,79 \pm 2,32$  pA ( $n = 6$ ), begleitet von einer signifikanten Frequenzabnahme der spontanen Einwärtsströme  $0,99 \pm 0,14$  Hz vs.  $0,48 \pm 0,10$  Hz ( $p = 0,02$ , t-Test) (siehe **Abbildung 4.10**; Abschnitt 3 und 4). Die Eigenschaften des Einwärtsstrommusters waren rasch reversibel, wenn das Haltepotential von -30 auf -40 mV zurückgestellt wurde. Unter diesen Bedingungen wurden durch Zugabe von 10 µM Nifedipin die ausgelösten Ströme bei einem Haltepotential von -40 mV aufgehoben (siehe **Abbildung**

4.10; Abschnitt 5) sowie die spontanen Einwärtsströme. Übrig blieb nur der kapazitive Strom.

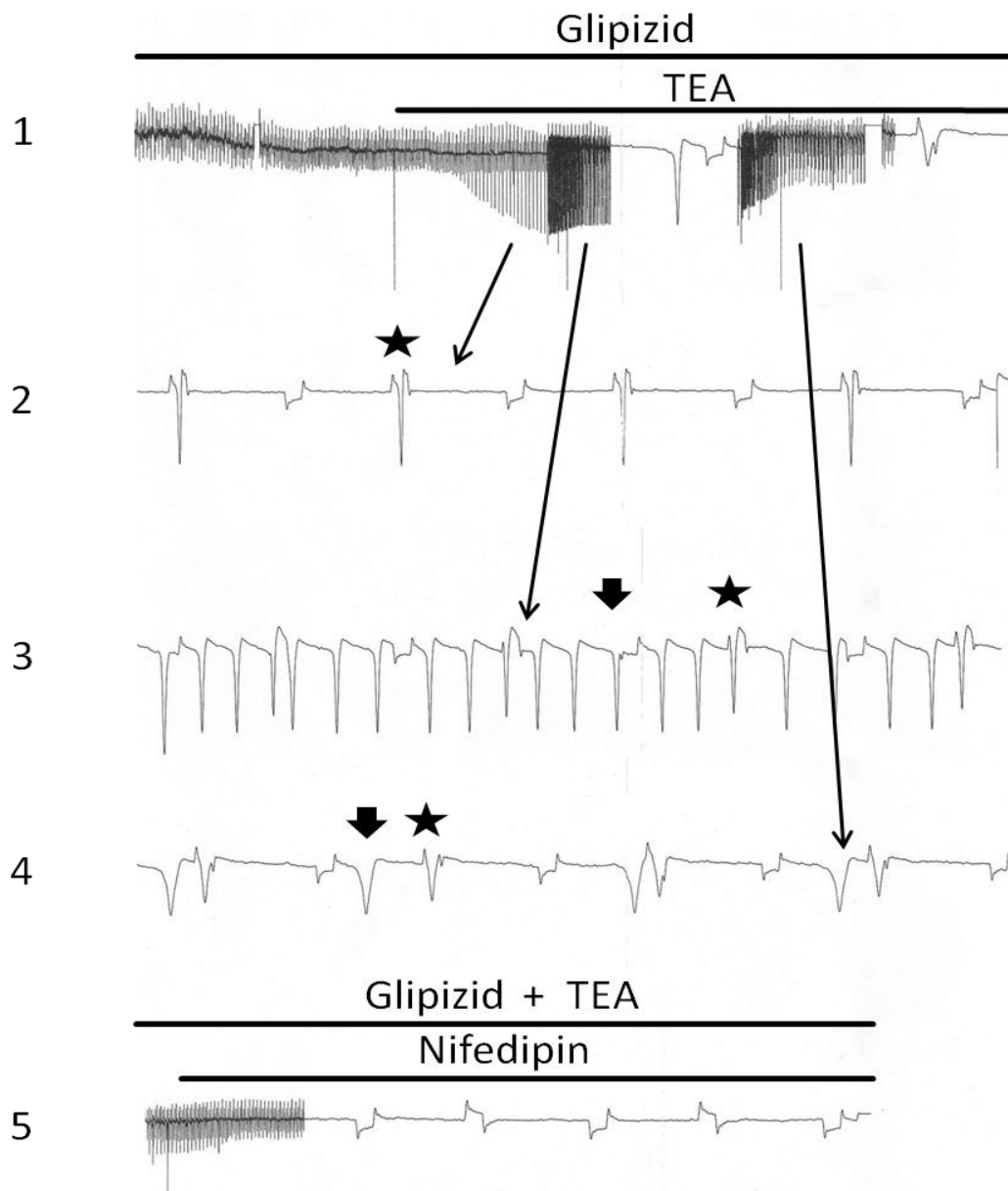
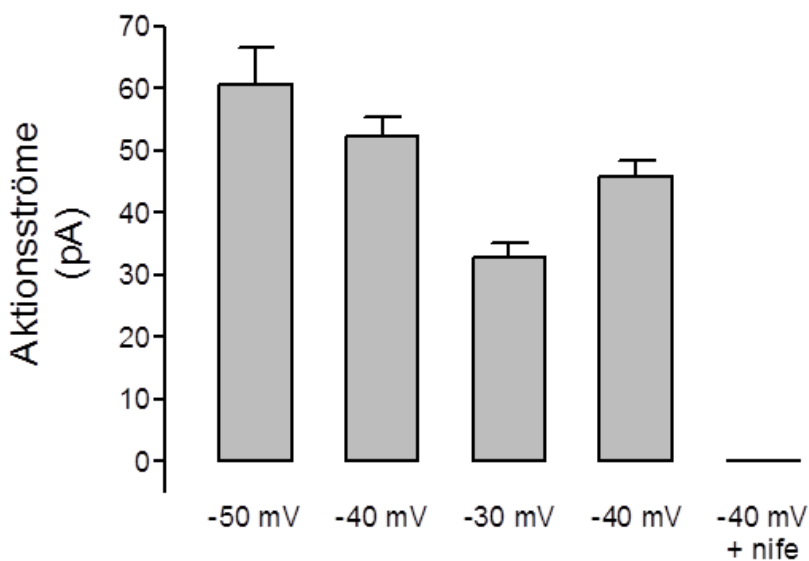


Abbildung 4.10 Effekt von Nifedipin auf Depolarisations-induzierte Einwärtsströme in einer primären Beta-Zelle der Maus.

Original-Aufzeichnung der Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin auf Ströme durch hyper- und depolarisierende Schritte von 10 mV bei einem Haltepotential von -40 mV in Gegenwart von Glipizid und TEA. Abschnitt 1 und 5 geben eine Übersicht des gesamten Experiments. Abschnitte 2, 3 und 4 zeigen Segmente mit einer ausgedehnten Zeitskala. Einwärtsströme werden sichtbar durch zusätzliche Anwesenheit von 10 mM TEA und 2,7  $\mu\text{M}$  Glipizid. Daraufhin wurde das Haltepotential von -50 (Abschnitt 2) auf -40 (Abschnitt 3) und auf -30 mV (Abschnitt 4) angehoben. Bei -50 mV werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme nur in Reaktion auf den depolarisierenden Schritt (Abschnitt 2) sichtbar, bei -40 mV herrscht eine kontinuierliche Aktivität (Abschnitt 3). Bei -30 mV wird die Frequenz der aktuellen Aktion wesentlich reduziert sowohl als auch die Amplitude der spontanen ( $\blacktriangledown$ ) und der getriggerten ( $\star$ ) Einwärtsströme (Abschnitt 4). Einwärtsströme werden ausgehend von der Situation in Abschnitt 4 durch 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin (Abschnitt 5) aufgehoben und es bleiben nur die kapazitiven Ströme sichtbar. Originalregistrierung ist repräsentativ für 5 Versuche.

In **Abbildung 4.11** sind die Spitzenwerte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme des jeweiligen Abschnitts zusammengefasst dargestellt.

10  $\mu\text{M}$  Nifedipin unterdrückten also vollständig die getriggerten Einwärtsströme als auch die beim Haltepotential von -40 mV häufig auftretenden spontanen Einwärtsströme, die die gleichen Charakteristika aufwiesen wie die getriggerten Einwärtsströme. Das Auslöschen des einwärts gerichteten Stroms durch Nifedipin könnte somit daraufhin deuten, dass es sich um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom handelt, der über einen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vermittelt ist.



**Abbildung 4.11**

Spitzenwerte von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen induziert durch depolarisierende Schritte von 10 mV ausgehend von einem Haltepotential von -50, -40 und -30 mV und Inhibition durch Nifedipin. Das gleiche Protokoll wurde verwendet, wie oben in **Abbildung 4.6a** gezeigt, jedoch wurde das Haltepotential wieder auf -40 mV vor Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin (nife) eingestellt. Nifedipin führte zu einer vollständigen Unterdrückung der getriggerten Einwärtsströme. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 Versuchen.

Nun sollte untersucht werden, welche Wirkung ein unspezifischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker, wie Cobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ), auf den Depolarisations-induzierten Calcium-Einwärtsstrom hat. Dazu wurde das Experiment mit dem identischen Protokoll wie in **Abbildung 4.10** durchgeführt und anstelle von Nifedipin 2,5 mM Cobaltchlorid eingesetzt (siehe **Abbildung 4.12**). Auch hier wurde das gleiche Phänomen wie oben beschrieben beobachtet. Bei einem Haltepotential von -40 mV wurden die ausgelösten Einwärtsströme auch durch Zugabe des unselektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockers Cobaltchlorid vollständig aufgehoben, sodass das identische Bild wie in **Abbildung 4.10** im Abschnitt 5 resultierte.



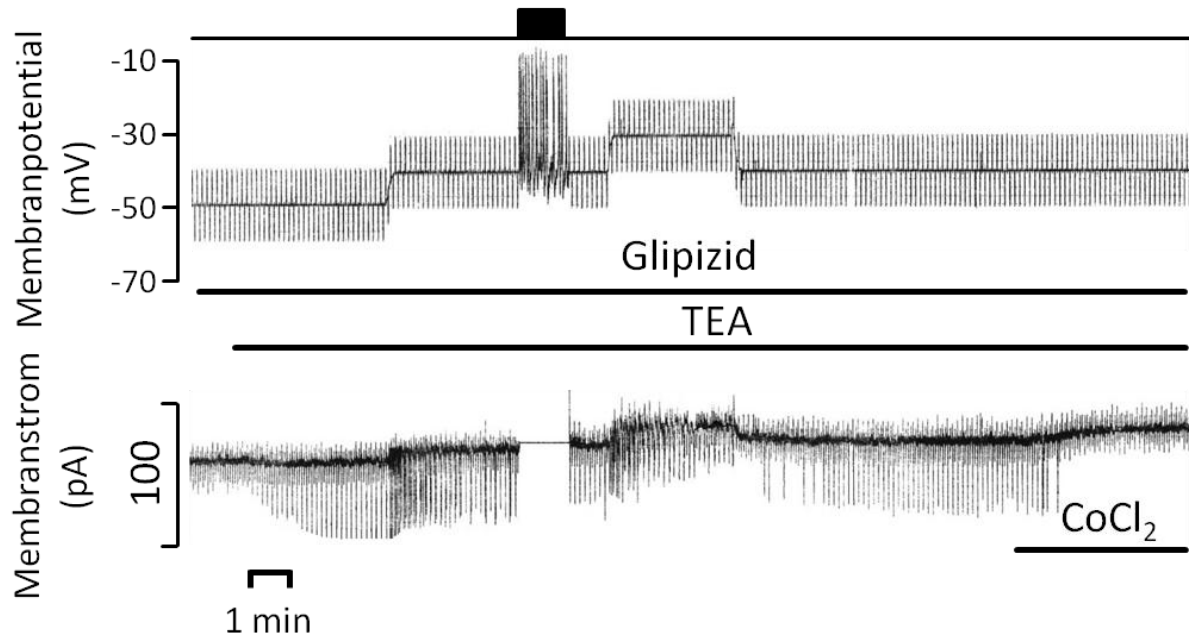


Abbildung 4.12 Effekt von Cobaltchlorid auf Depolarisations-induzierte Einwärtsströme in einer primären Beta-Zelle der Maus.

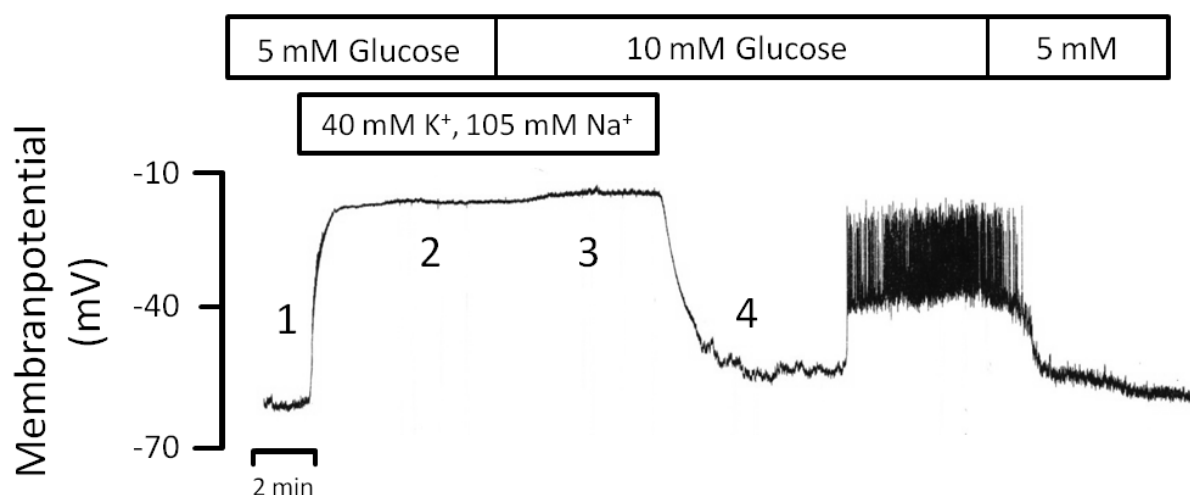
Registrierung einer gleichzeitigen Aufnahme des Membranpotentials (oberer Abschnitt) sowie Membranstroms (unterer Abschnitt), beim Umschalten zwischen Current-Clamp- und Voltage-Clamp-Modus (veranschaulicht durch den oberen schwarzen Balken). Original-Aufzeichnung zeigt die Wirkung von 2,5 mM Cobaltchlorid auf Ströme durch ausgelöste hyper- und depolarisierenden in 10 mV Schritten bei Haltepotentialen von -50, -40 und -30 mV in Gegenwart von Glipizid und TEA. Einwärtsströme werden sichtbar durch Zugabe von 10 mM TEA auf 2,7  $\mu$ M Glipizid. Daraufhin wurde das Haltepotential stufenweise von -50 bis auf -30 mV angehoben und wieder zurück auf -40 mV. Daraus resultierte eine identische Reaktion sowie Verhalten der Einwärtsströme wie in Abbildung 4.10 zu sehen. Für eine vergrößerte Zeitskala siehe dazu Abbildung 4.10. Nach Rückstellung des Haltepotentials von -30 auf -40 mV ist das Verhaltensmuster der Einwärtsströme reversibel. Die Einwärtsströme werden durch 2,5 mM Cobaltchlorid aufgehoben und es sind nur kapazitive Ströme sichtbar. Originalregistrierung ist repräsentativ für 5 Versuche.

Das heißt also, dass der durch Glipizid und TEA darstellbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Einwärtsstrom, der durch Depolarisationsschritte bei einem Haltepotential von -40 mV ausgelöst wird, von einem spezifischen Blocker des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals ebenso vollständig blockiert wird wie von einem unspezifischen Blocker des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms.

### 4.3 Abhängigkeit der Depolarisation durch 40 mM KCl von der extrazellulären $\text{Na}^+$ -Konzentration

Perifusions-Messungen der durch 40 mM KCl induzierten Insulinsekretion zeigten, dass die kompensatorische Reduktion der Natriumchloridkonzentration (105 mM NaCl) die stimulierende Wirkung von 10 mM Glucose wiederherstellte, nicht jedoch diejenige von 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid, die beide bei einer langandauernden Depolarisation durch 40 mM KCl gehemmt war. Es stellte sich die Frage, ob dieser Unterschied durch ein unterschiedliches Depolarisationsmuster bedingt sein könnte.

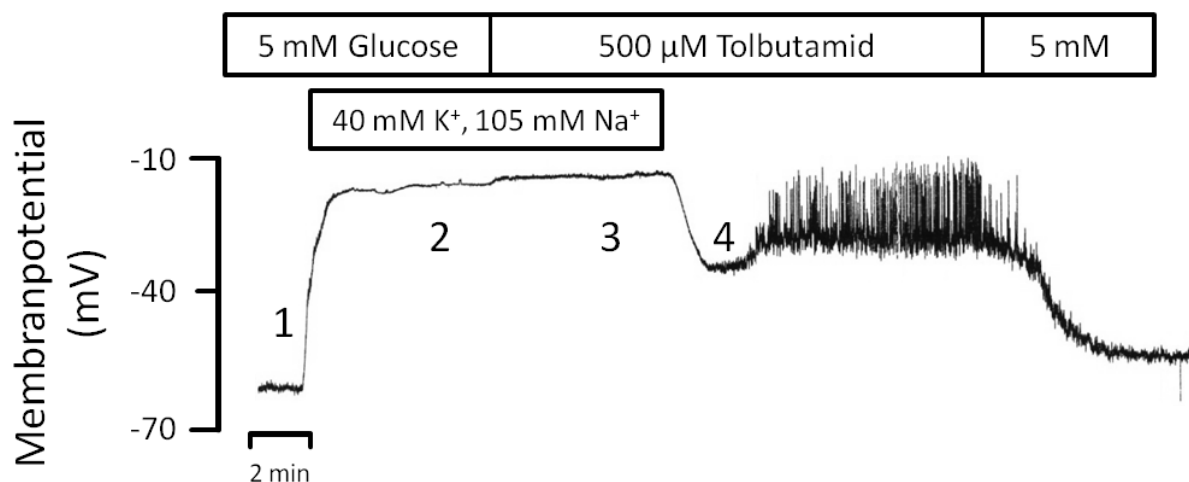
In Gegenwart von 5 mM Glucose depolarisierten 40 mM KCl mit einer kompensatorischen Reduktion der NaCl-Konzentration die Zellmembran von einem Ruhemembranpotential von  $-62,31 \pm 0,57$  mV ( $n = 6$ ) auf ein Plateaupotential von  $-19,20 \pm 0,71$  mV. Daraus ergibt sich eine Differenz von  $43,12 \pm 0,91$  mV. In diesem  $\text{Na}^+$ -reduzierten Medium verursachten 10 mM Glucose eine kleine weitere Depolarisation um  $1,97 \pm 1,01$  mV ( $n = 6$ ) (siehe **Abbildung 4.13**). Dieser Anstieg war marginal signifikant ( $p = 0,07$ , t-Test). Anschließend wurden 40 mM KCl in permanenter Anwesenheit von EZ mit 10 mM Glucose ausgewaschen, woraufhin die Plasmazellmembran temporär repolarisierte, bis die Beta-Zelle mit dem typischen slow-waves-Muster auf 10 mM Glucose reagierte. Ein Auswaschen der stimulatorischen Glucosekonzentration bewirkte eine vollständige Repolarisierung auf Ruhemembranpotentialniveau.



**Abbildung 4.13** Depolarisierende Wirkung von 40 mM  $\text{K}^+$  in Anwesenheit einer kompensatorisch reduzierten  $\text{Na}^+$ -Konzentration (105 mM).

Nach Erreichen eines stabilen Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen mit 40 mM KCl bei gleichzeitiger Reduzierung des NaCl-Gehalts ausgesetzt. Nach Einstellen eines steady-states der Depolarisation wurde die Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM angehoben. Im Anschluss wurde KCl in ständiger Anwesenheit von 10 mM Glucose ausgewaschen. Originalregistrierung ist repräsentativ für 6 Experimente.

Nun wurde anstatt einer stimulatorischen Glucosekonzentration 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid als Stimulus verwendet (siehe **Abbildung 4.14**). Nach Erreichen eines Ruhemembranpotentials von  $-61,76 \pm 0,57 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ) depolarisierte die Zellmembran in Anwesenheit von 40 mM KCl mit einer kompensatorischen Reduktion der NaCl-Konzentration auf ein Membranpotential von  $-19,67 \pm 0,43 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ). Die Differenz von diesem Depolarisationsanstieg beträgt  $42,09 \pm 0,71 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ). Auch in diesem  $\text{Na}^+$ -reduzierten Medium bewirkten 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid eine marginale Depolarisationssteigerung um  $1,66 \pm 0,48 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ). Hierbei war aber dieser Anstieg für Tolbutamid ( $p = 0,009$ , t-Test) signifikant.



**Abbildung 4.14** Depolarisierende Wirkung von 40 mM  $\text{K}^+$  in Anwesenheit einer kompensatorisch reduzierten  $\text{Na}^+$ -Konzentration (105 mM).

Nach Erreichen eines stabilen Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen mit 40 mM KCl bei gleichzeitiger Reduzierung des NaCl-Gehalts stimuliert. Nach Einstellen eines steady-states der Depolarisation wurde anstatt einer stimulatorischen Glucosekonzentration 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid als Stimulus verwendet. Im Anschluss wurde KCl in ständiger Anwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid ausgewaschen. Originalregistrierung ist repräsentativ für 5 Experimente.

Auch hier war beim Auswaschen der erhöhten Konzentration eine Repolarisation (trotz der Anwesenheit von Tolbutamid) zu beobachten. Sie war jedoch geringer ausgeprägt als diejenige in Gegenwart von 10 mM Glucose. Sie dauerte 165 s (bei Glucose 360 s) und erreichte maximal ein Potential von  $-38,86 \pm 2,54 \text{ mV}$  ( $n = 5$ ) vs. Glucose  $-47,19 \pm 2,48 \text{ mV}$  ( $n = 6$ ).

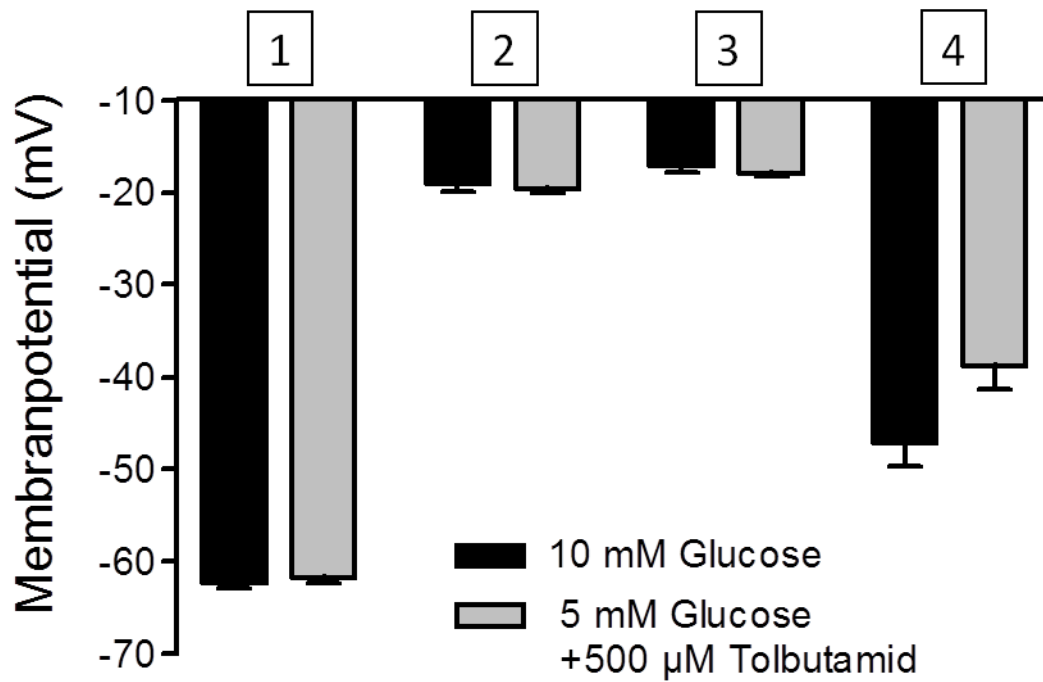


Abbildung 4.15

Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 oder 6 Versuchen für die jeweiligen Bedingungen, wie durch die Zahlen in den Abbildungen 4.13 sowie 4.14 gekennzeichnet. Es gab nur eine minimale weitere Depolarisation von weniger als 2 mV durch Erhöhung der Glucosekonzentration oder durch Zugabe von Tolbutamid bei einer kontinuierlichen Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  mit einer kompensatorischen Reduktion der NaCl-Konzentration.

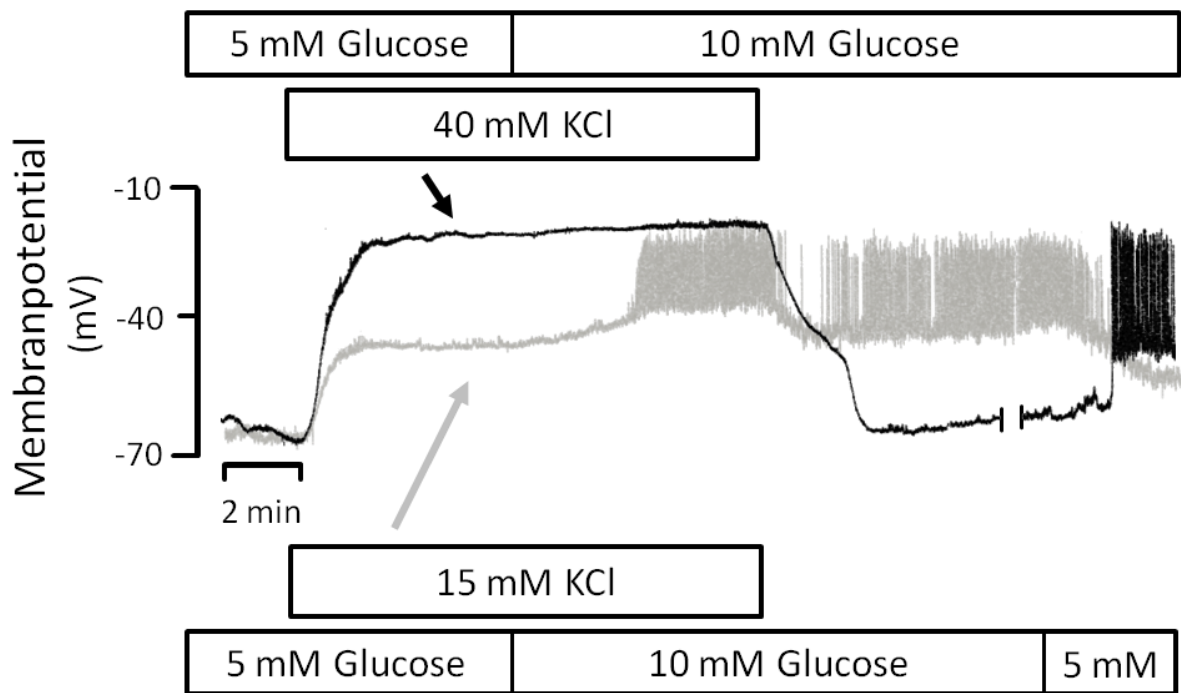
Hinsichtlich der unterschiedlichen Konsequenz der kompensatorischen  $Na^+$ -Reduktion für die sekretionssteigernde Wirkung von 10 mM Glucose und 500 µM Tolbutamid lässt sich festhalten, dass sie nicht durch ein unterschiedliches Depolarisationsmuster (v.a. durch den Verlust der Wirkung von Tolbutamid) bedingt ist.

#### 4.4 Versuche zur Repolarisation

Wie in den Versuchen in Kapitel 4.3 war es auch bei anderen Versuchen, in denen eine Kaliumdepolarisation verwendet wurde, aufgefallen, dass es beim Auswaschen der erhöhten Kaliumkonzentration trotz der Anwesenheit von  $K_{ATP}$ -Kanal blockierenden Stimuli zu einer vorübergehenden Repolarisation kam. Dieses Phänomen sollte genauer charakterisiert werden.

In Gegenwart von 5 mM Glucose war das Ruhemembranpotential  $-63,69 \pm 0,70$  mV ( $n = 5$ ). 15 mM  $K^+$  depolarisierten um rund 20 mV, 40 mM  $K^+$  um etwa 40 mV (siehe **Abbildung 4.16**). Eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM führte in Gegenwart von 15 mM  $K^+$  zu einem weiteren Anstieg des Depolarisationsplateaus und das Auftreten von Aktionspotentialen ( $18,3 \pm 2,7$  mV Amplitude), aber nicht in Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  (siehe **Abbildung 4.16, schwarze Registrierung**). Nach der Exposition von 15 mM KCl, zurück zu physiologischen  $K^+$ -Konzentrationen in Gegenwart von 10 mM Glucose führte dies zu einer vorübergehenden Abnahme der Aktionspotential-Frequenz, gelegentlich auch zu einer teilweisen Repolarisation, danach setzten wieder erneut Aktionspotentiale mit leicht erhöhter Amplitude ein (siehe **Abbildung 4.16, graue Registrierung**).

Im Vergleich dazu führte ein Auswaschen von 40 mM KCl in Anwesenheit von 10 mM Glucose zu einer vollständigen Repolarisation, die mehrere Minuten (im Mittelwert 10:30 min) andauerte, dann setzten abrupt wieder Aktionspotentiale ausgehend von einem Depolarisationsplateau ein (siehe **Abbildung 4.16**). Offenbar interferieren 40 mM KCl mit den Depolarisation-Mechanismen bei einer stimulierenden Glucosekonzentration.

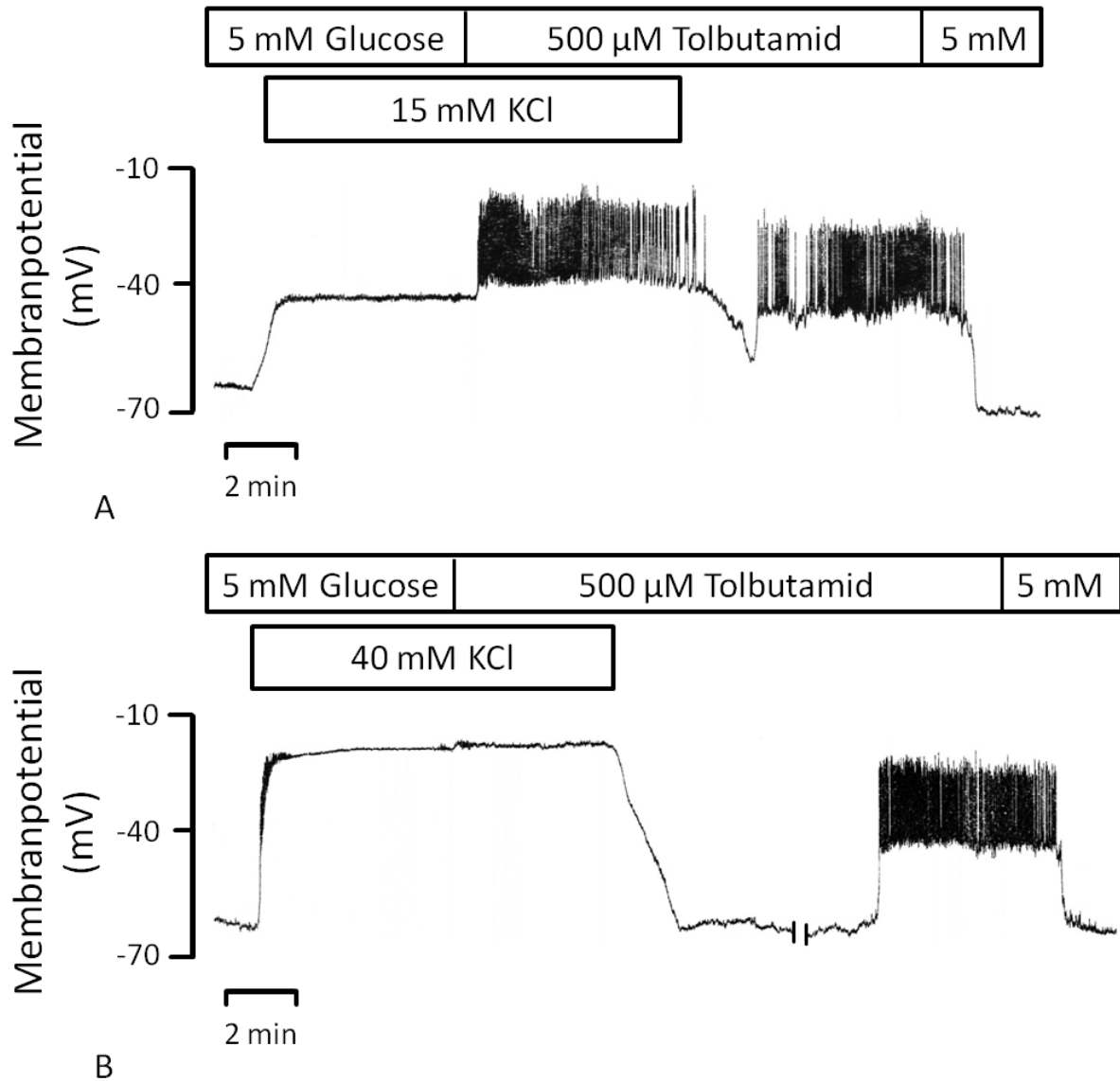


**Abbildung 4.16** Depolarisierende Wirkung von  $K^+$  auf das Beta-Zell-Plasmamembranpotential in Gegenwart einer basalen (5 mM) und einer moderaten stimulatorischen Glucosekonzentration (10 mM).

Nach Erreichen des Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen 15 (graue Registrierung) oder 40 mM KCl (schwarze Registrierung) ausgesetzt. Nach Einstellen eines steady-states des Depolarisationsplateaus wurde die Glucosekonzentration von 5 auf stimulatorische 10 mM angehoben. Anschließend wurde KCl in kontinuierlicher Anwesenheit mit 10 mM Glucose ausgewaschen, das zur Identifizierung von Beta-Zellen diente. Originalregistrierungen sind jeweils repräsentativ für 4 oder 5 Versuche.

In den nachfolgenden Experimenten wurde an Stelle des Nährstoffstimulus Glucose unter den identischen Bedingungen, wie in **Abbildung 4.10**, nun der  $K_{ATP}$ -Kanalblocker Tolbutamid in einer maximal wirksamen Konzentration (500  $\mu$ M) verwendet, um den  $K_{ATP}$ -Kanal durch Bindung an SUR1 zu schließen. Damit sollte die Rolle des gesteigerten Energiestoffwechsels durch Glucose-Exposition hinsichtlich der Repolarisation untersucht werden. In Gegenwart von 5 mM Glucose war das Ruhemembranpotential  $-63,86 \pm 0,75$  mV ( $n = 5$ ). Ebenfalls depolarisierten 15 mM  $K^+$  um rund 20 mV (siehe **Abbildung 4.17 (A)**) und 40 mM  $K^+$  um etwa 40 mV (siehe **Abbildung 4.17 (B)**). Die Zufuhr von 500  $\mu$ M Tolbutamid führte in Gegenwart von 15 mM  $K^+$  zu einem weiteren Anstieg des Depolarisationsplateaus und das Auftreten von Aktionspotentialen (17,6  $\pm$  3,2 mV Amplitude), aber nicht in Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  (siehe **Abbildung 4.17 (B)**). Das Auswaschen von 15 mM KCl in andauernder Gegenwart von 500  $\mu$ M Tolbutamid führte zu einer vorübergehenden Abnahme der Aktionspotential-Frequenz, gelegentlich auch zu einer teilweisen Repolarisation, danach setzten wieder

erneut Aktionspotentiale mit leicht erhöhter Amplitude ein (siehe **Abbildung 4.17 (A)**). Im Anschluss wurde Tolbutamid mit EZ in Gegenwart von 5 mM Glucose ausgewaschen und das Ruhemembranpotential von  $-65,33 \pm 1,64$  mV ( $n = 5$ ) erreicht.



**Abbildung 4.17** Depolarisierende Wirkung von 15 mM (A) oder 40 mM K<sup>+</sup> (B) auf das Beta-Zell-Plasmamembranpotential in Gegenwart einer maximalen Tolbutamidkonzentration von 500 µM.

Nach Erreichen des Ruhemembranpotentials wurden Beta-Zellen jeweils mit 15 oder 40 mM KCl perfundiert. Nach Erreichen eines steady-states des Depolarisationsplateaus wurden zusätzlich 500 µM Tolbutamid angeboten. Anschließend wurde KCl in kontinuierlicher Anwesenheit mit 500 µM Tolbutamid ausgewaschen. Ein Wash-out von Tolbutamid mit EZ bewirkte eine Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials. Originalregistrierungen sind jeweils repräsentativ für 5 Versuche.

Auch in Gegenwart von Tolbutamid bewirkte ein Auswaschen von 40 mM KCl eine vollständige Repolarisation, die über wenige Minuten (im Mittelwert 4:10 min) anhielt.

Danach setzten abrupt wieder Aktionspotentiale ausgehend von einem Depolarisationsplateau ein (siehe **Abbildung 4.17 (B)**).

Das heißt, offenbar interferiert KCl bei längerer Exposition konzentrationsabhängig mit den Depolarisation-Mechanismen, die durch  $K_{ATP}$ -Kanalblockade ausgelöst werden, unabhängig davon ob die  $K_{ATP}$ -Kanalblockade durch einen Aktivator des Energiestoffwechsels oder durch ein direkt angreifendes Pharmakon bewirkt wird.



#### 4.5 Wirkung der Depolarisation durch $K_{ATP}$ -Kanalblockade auf die cytosolische Calciumkonzentration im Vergleich mit der Depolarisation durch KCl

Frühere, in einem anderen Zusammenhang durchgeführte Messungen der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration ergaben, dass der Anstieg, der durch 40 mM KCl hervorgerufen wird, noch über das Niveau hinausgeht, welches durch eine längerdauernde Exposition mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Imidazolin Efaroxan etabliert war (Hatlapatka et al. 2009). Diese Beobachtung sollte unter dem jetzigen Gesichtspunkt, inwieweit die Konsequenzen einer KCl Depolarisation denen eines  $K_{ATP}$ -Kanalschlusses gleichen, bestätigt und ausgebaut werden.

Dafür wurden frisch isolierte Pankreasinseln der Maus für 90 Minuten in Gegenwart von Krebs-Ringer-Puffer (siehe 3.3.1.1) bei physiologischer Temperatur von 37°C umströmt. Ausgehend von einem durchschnittlichen Fura-Ratio-Wert von 33 bewirkte eine 10-minütige Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  einen einphasigen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf fast das Doppelte (60) des anfänglichen Fura-Ratio-Wertes wonach dieser auf einem durchschnittlichen Plateau-Ratio-Wert von 53 abfiel (siehe **Abbildung 4.18**). Nach Absenkung der  $K^+$ -Konzentration auf 5,9 mM entstand eine Basislinie bei Fura-Ratio-Werten von 37. Ab Minute 40 wurden die Inseln mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration (500  $\mu$ M) des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid perfundiert. Daraufhin stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  in kurzer Zeit an, erkennbar durch einen Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte mit einer Ausbildung eines steady-state Wertes von 47, welches dem Plateau des durch 40 mM  $K^+$  induzierten  $Ca^{2+}$ -Anstiegs zwischen Minute 20 bis 30 entspricht. Wurden die Inseln bei fortdauernder Anwesenheit von Tolbutamid nun zusätzlich ab Minute 60 für 10 Minuten mit 15 mM KCl umströmt, konnte ein weiterer  $Ca^{2+}$ -Peak oberhalb des durch Tolbutamid induzierten Plateaus initiiert werden (siehe **Abbildung 4.18**). Dieser Peak erreicht nicht das gleiche Ausmaß (54 vs. 60) wie bei einer alleinigen  $K^+$ -Depolarisation mit 40 mM. Dennoch ist ein gleiches Verlaufsmuster mit einem ähnlichen durchschnittlichen Fura-Ratio-Wert von 53 feststellbar. Nach Auswaschen der erhöhten Kaliumkonzentration wurde der gleiche Fura-Ratio-Wert wie vor der Zugabe von 15 mM KCl erreicht. Und nach Auswaschen von Tolbutamid (ab Minute 85) wurde der Fura-Ratio-Wert, der vor der Tolbutamid-Zugabe bestanden hatte, wieder erreicht.

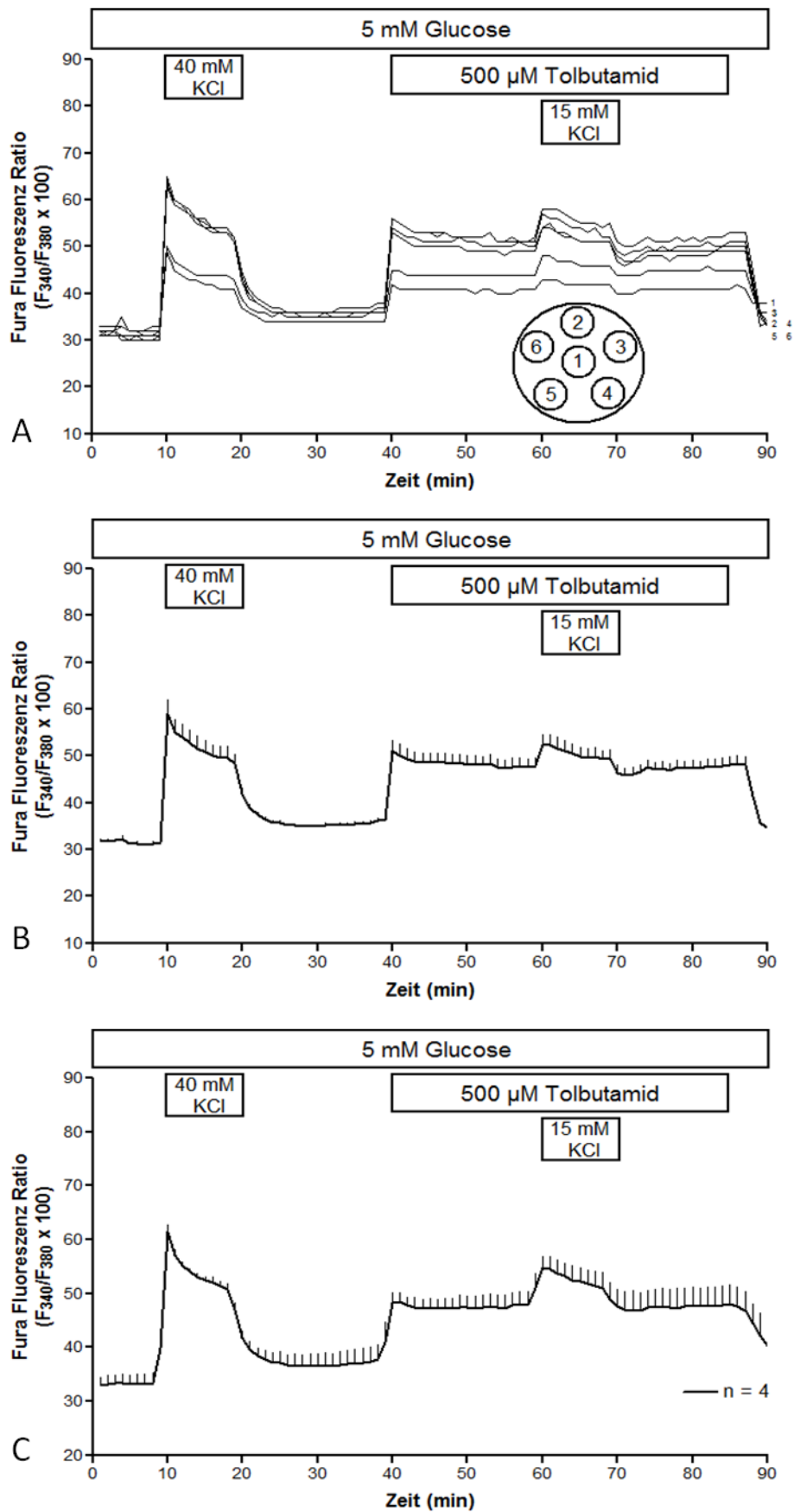


Abbildung 4.18 Modifizierung des Tolbutamid-induzierten Effekts durch gleichzeitige Exposition mit 15 mM KCl.

Die kultivierte und mit Fura-PE3/AM beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Lösung in Anwesenheit von 5 mM Glucose perfundiert (Minute 0 bis 90). Nach Depolarisation mit 40 mM  $K^+$  für 10 Minuten (Minute 10 bis 20) wurde die Insel nach einer 20-minütigen Auswaschphase mit 500  $\mu$ M Tolbutamid umströmt (Minute 40 bis 85). Ab Minute 60 wurden diesem Medium für 10 Minuten zusätzlich 15 mM  $K^+$  zugesetzt (Minute 60 bis 70). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment (A), ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus diesem Einzelexperiment (B) und ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4 Versuchen (C). Die umströmten Pankreasinseln für dieses Versuchsprotokoll wurden aus einer Präparation gewonnen.

In den nächsten Versuchen wurden unter den gleichen Bedingungen sowie unter der gleichen Versuchsanordnung frisch isolierte Pankreasinseln der Maus ebenfalls zu Beginn für 10 Minuten mit 40 mM KCl depolarisiert. Nach einer 20-minütigen Auswaschphase von 40 mM KCl wurde der Tolbutamid-induzierte Effekt auf die cytosolische Calciumkonzentration anstatt mit 15 mM dieses Mal mit 40 mM KCl depolarisiert. Ausgehend von einem durchschnittlichen Fura-Ratio-Wert von 35 bewirkte eine 10-minütige Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  einen starken Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf einen Fura-Ratio-Wert von 61, wonach dieser spontan auf einem angedeuteten Plateau-Ratio-Wert von 52 abfällt (siehe **Abbildung 4.19**). Nach Absenkung der  $K^+$ -Konzentration auf 5,9 mM wurden die anfänglichen Fura-Ratio-Werte nicht mehr erreicht. Ab Minute 40 wurden die Inseln mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration (500  $\mu$ M) des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid perfundiert. Daraufhin stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  in kurzer Zeit an, erkennbar durch einen Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte mit einer Ausbildung eines steady-state Wertes von 52, der dem durch 40 mM KCl-induzierten Plateau der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen Minute 20 bis 30 entspricht. Wurden die Inseln bei fortdauernder Anwesenheit von Tolbutamid nun zusätzlich ab Minute 60 für 10 Minuten mit 40 mM KCl umströmt, konnte ein weiterer  $Ca^{2+}$ -Peak oberhalb des durch Tolbutamid induzierten Plateaus initiiert werden. Trotz der nun höheren  $K^+$ -Konzentration erreicht der Peak nicht das gleiche Ausmaß (58 vs. 61) wie bei einer alleinigen  $K^+$ -Depolarisation mit 40 mM (siehe **Abbildung 4.19**). Nach Auswaschen der erhöhten Kaliumkonzentration wurde der gleiche Fura-Ratio-Wert wie vor der Exposition von 40 mM KCl erreicht. Und nach Auswaschen von Tolbutamid (ab Minute 85) wurde der Fura-Ratio-Wert, der vor der Tolbutamid-Zugabe bestanden hatte, wieder erreicht. Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen 40 mM KCl und Tolbutamid lässt annehmen, dass die Inseln bei diesen Versuchen weniger gut den Belastungen standhalten als im vorangegangenen Versuchsblock.

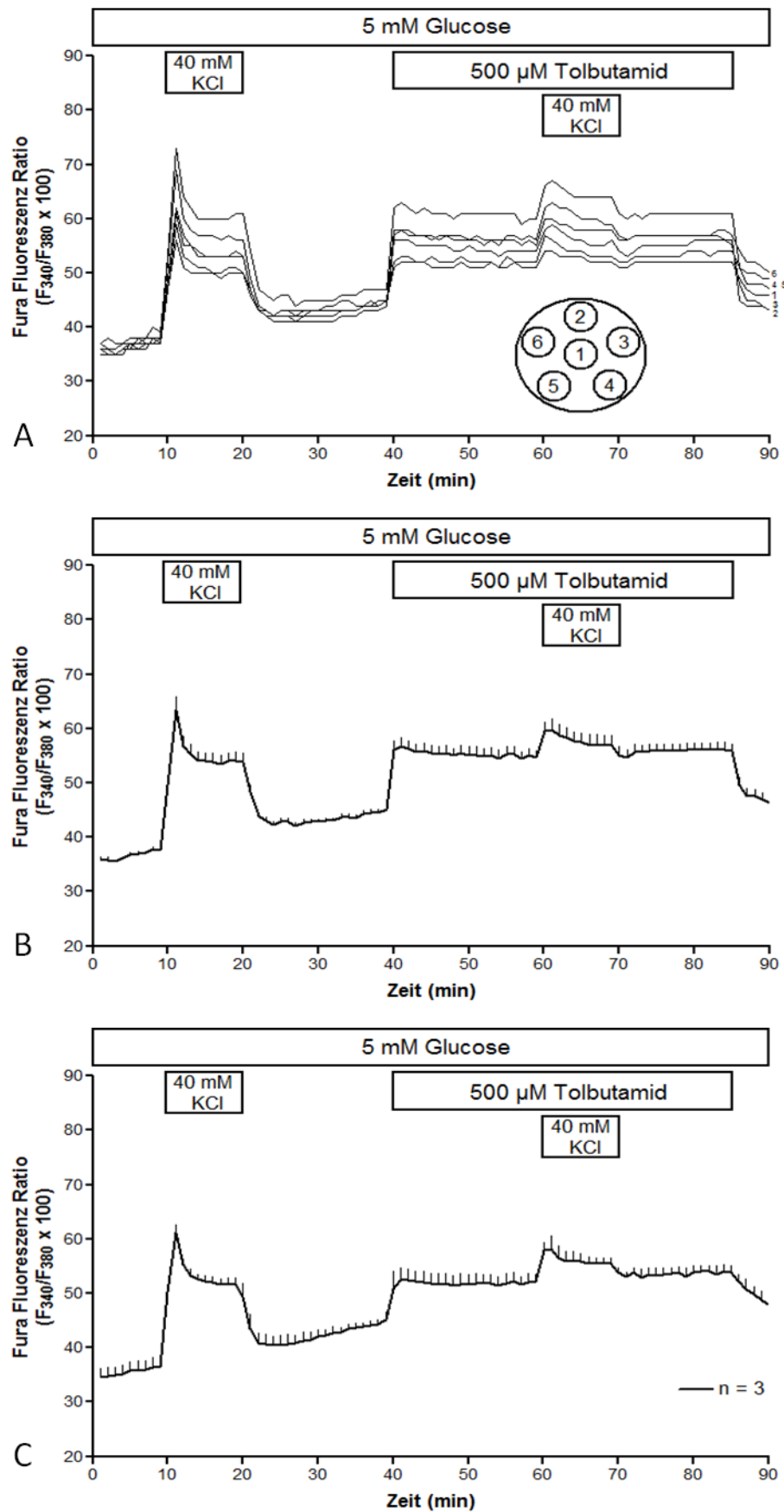


Abbildung 4.19 Modifizierung des Tolbutamid-induzierten Effekts durch gleichzeitige Exposition mit 40 mM KCl.

Die kultivierte und mit Fura-PE3/AM beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Lösung in Anwesenheit von 5 mM Glucose perfundiert (Minute 0 bis 90). Nach Depolarisation mit 40 mM  $K^+$  für 10 Minuten (Minute 10 bis 20) wurde die Insel nach einer 20-minütigen Auswaschphase mit 500  $\mu$ M Tolbutamid umströmt (Minute 40 bis 85). Ab Minute 60 wurden diesem Medium für 10 Minuten zusätzlich 40 mM  $K^+$  zugesetzt (Minute 60 bis 70). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment (A), ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus diesem Einzelexperiment (B) und ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Versuchen ( $n = 3$ ). Die umströmten Pankreasinseln für dieses Versuchsprotokoll wurden aus einer Präparation gewonnen.

In der **Abbildung 4.20** wurde der Effekt von jeweils 15 und 40 mM  $K^+$  auf die cytosolische Calciumkonzentration bei gleichzeitiger Anwesenheit von 500  $\mu$ M Tolbutamid gegenübergestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass beide  $K^+$ -Konzentrationen einen Peak oberhalb des von Tolbutamid bewirkten Plateaus initiieren, der praktisch von gleichem Ausmaß ist. Allerdings zeigt der durch 15 mM KCl hervorgerufene Peak größere Standardabweichungen als der durch 40 mM KCl induzierte Peak.

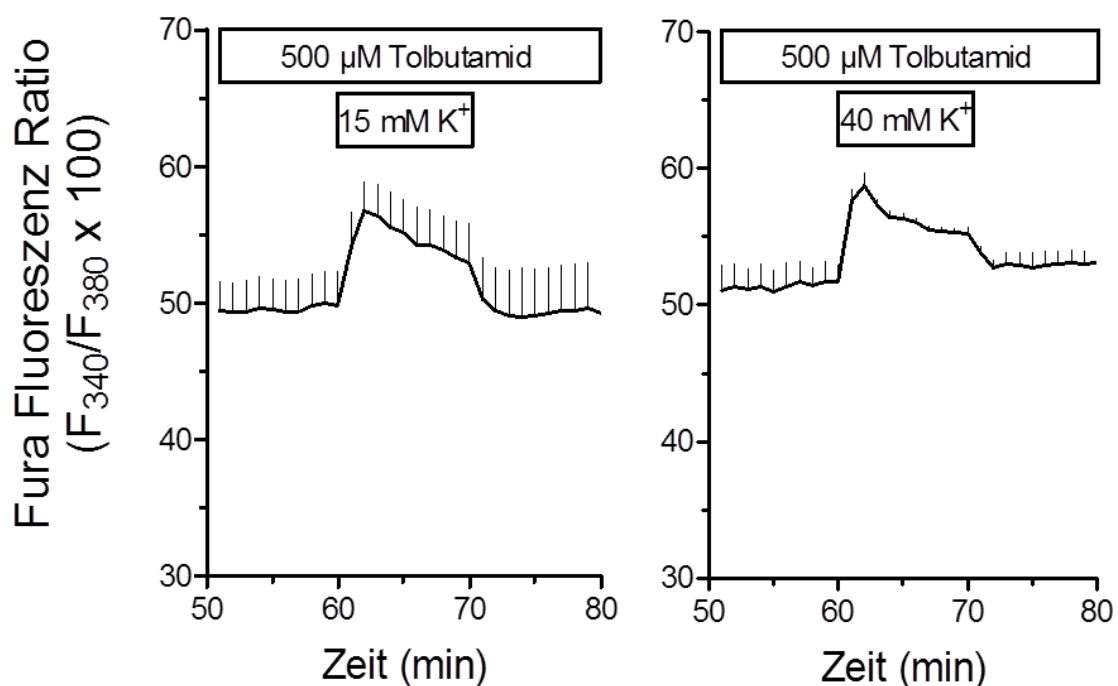
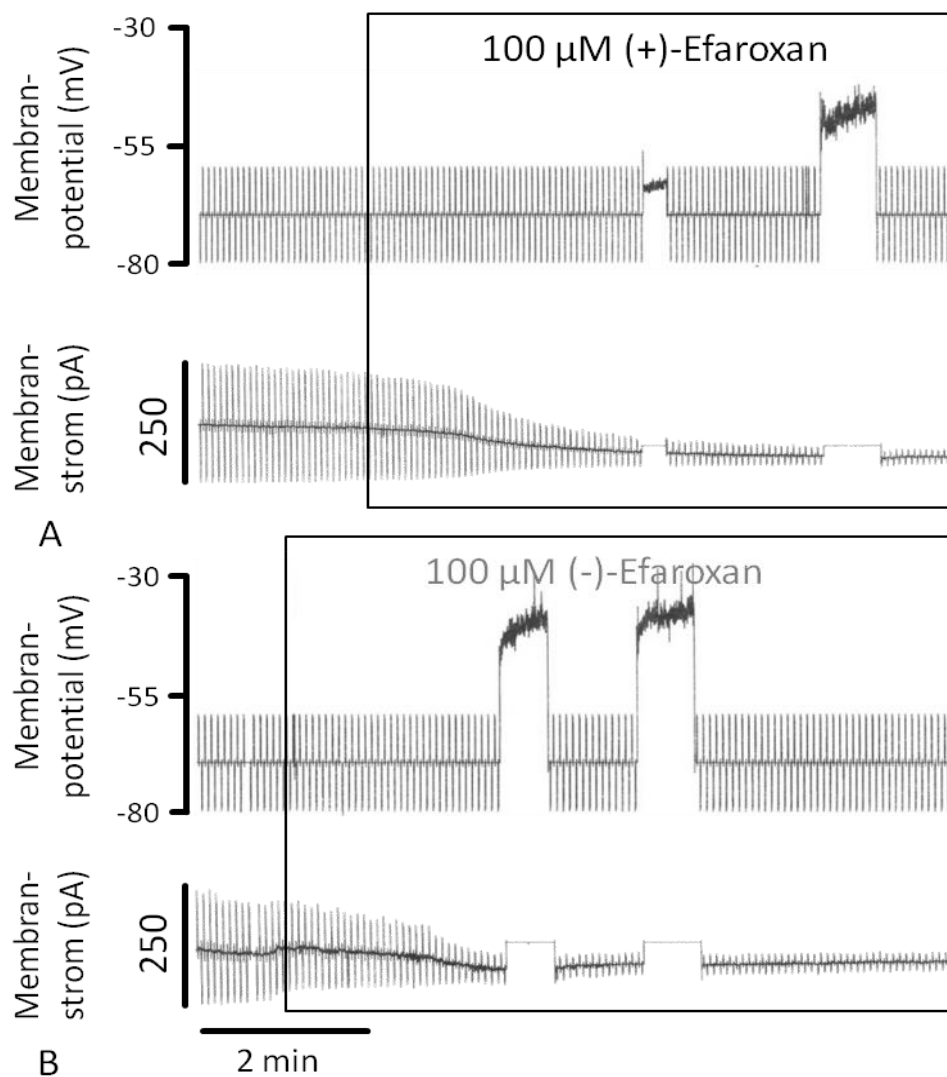


Abbildung 4.20 Vergleich der Auswirkungen von 15 und 40 mM KCl bei gleichzeitiger Anwesenheit von 500  $\mu$ M Tolbutamid auf die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Pankreasinseln der Maus.

Zeigt einen Ausschnitt von Minute 50 – 80 jeweils aus den Abbildungen 4.18 und 4.19. Während einer 45-minütigen Tolbutamid-Exposition wurde für 10 Minuten die  $K^+$ -Konzentration entweder um 15 mM (linke Abbildung) oder um 40 mM  $K^+$  (rechte Abbildung) erhöht.

In früheren Untersuchungen zur Wirkung des  $K_{ATP}$ -Kanal blockierenden Imidazolins Efaroxan konnte nur das Racemat verwendet werden. Es sollte nun untersucht werden, ob Enantiomere des Efaroxans qualitativ sowie quantitativ gleichartig wirksam sind. Dabei wurde jeweils für das (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan das Membranpotential sowie Membranstrom mittels des Stimulationsprotokolls nach Trube (Trube et al. 1986) an einzelnen Beta-Zellen der Maus in der whole-cell Konfiguration und die cytosolische Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  an kultivierten Mausinseln gemessen.

Die Wirkung der Efaroxan-Enantiomere auf den Gesamtmembranstrom von einzelnen Beta-Zellen wurde als Reaktion auf hyper- und depolarisierende Schritte von 10 mV gemessen. Bei einem Haltepotential von -70 mV reduzierten beide Efaroxan-Enantiomere (100  $\mu$ M) den Membranstrom stark, aber nicht komplett (etwa um 76%, siehe **Abbildung 4.21**).

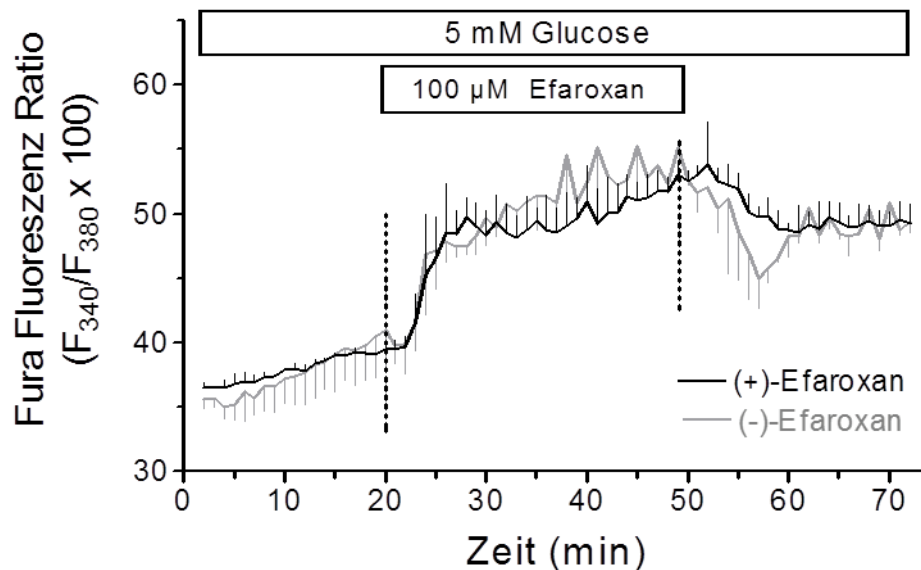


**Abbildung 4.21** Auswirkungen des Membranpotentials und Membranstroms durch (+)-Efaroxan (A) oder (-)-Efaroxan (B) an einzelnen Beta-Zellen.

Originalregistrierungen einer gleichzeitigen Aufnahme des Membranpotentials (oberer Abschnitt für A und B) sowie Membranstroms (unterer Abschnitt für A und B) jeweils durch die Wirkung von 100  $\mu\text{M}$  (+)-Efaroxan (A) und 100  $\mu\text{M}$  (-)-Efaroxan (B) an kultivierten Beta-Einzelnzellen der Maus. Registrierung des Gesamtmembranstroms wurde ausgelöst durch hyper- und depolarisierende Schritte von 10 mV ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV. Obere Abschnitte zeigen jeweils das Membranpotential durch das Stimulationprotokoll gesteuert, welches an zwei Zeitpunkten durch Umschalten in den Current-Clamp-Modus unterbrochen ist. Die Zeitperioden der Efaroxan-Exposition werden durch die Rechtecke angezeigt. Originalregistrierungen sind jeweils repräsentativ für 4 Versuche.

Durch Umschalten in den Current-Clamp-Modus wurde verifiziert, dass die Hemmung in einer deutlichen Depolarisation der Plasmamembran führte. Nach einer 10-minütigen Exposition beider Efaroxan-Enantiomere war das depolarisierte Membranpotential in Gegenwart von (+)-Efaroxan im Vergleich zum (-)-Efaroxan nicht signifikant unterschiedlich ( $-42,4 \pm 1,1$  vs.  $-43,3 \pm 2,4$  mV,  $n = 4$ ).

Zur Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Gegenwart beider Efaroxan-Enantiomere (100  $\mu\text{M}$ ) wurden isolierte Pankreasinseln der Maus für 70 Minuten in Krebs-Ringer-Lösung mit 5 mM Glucose umströmt (siehe **Abbildung 4.22**).



**Abbildung 4.22** Auswirkungen von (+)-Efaroxan (schwarzer Verlauf) oder (-)-Efaroxan (grauer Verlauf) auf die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an einzelnen Maus-Inseln.

Kultivierte und mit Fura-PE3/AM beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Lösung plus 5 mM Glucose für 70 Minuten perfundiert. Ab Minute 20 bis 50 enthielt das Medium entweder 100  $\mu\text{M}$  (+)-Efaroxan oder 100  $\mu\text{M}$  (-)-Efaroxan. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM jeweils aus 3 Versuchen. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus zwei verschiedenen Präparationen gewonnen.

Eine 30-minütige Anwesenheit (von Minute 20 bis 50) des jeweiligen Efaroxan-Enantiomers bewirkte einen langanhaltenden Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (siehe **Abbildung 4.22**). Nach Auswaschen des jeweiligen Efaroxan-Enantiomers war der Anstieg nur partiell reversibel, was zum Teil durch die Pharmakokinetik bedingt ist, andererseits aber auch wohl eine verminderte Fähigkeit der Zellen zur  $Ca^{2+}$ -Ausschleusung anzeigt. Letzteres wird an dem langsamen Fura-Ratio-Anstieg der Efaroxan-Exposition sichtbar.

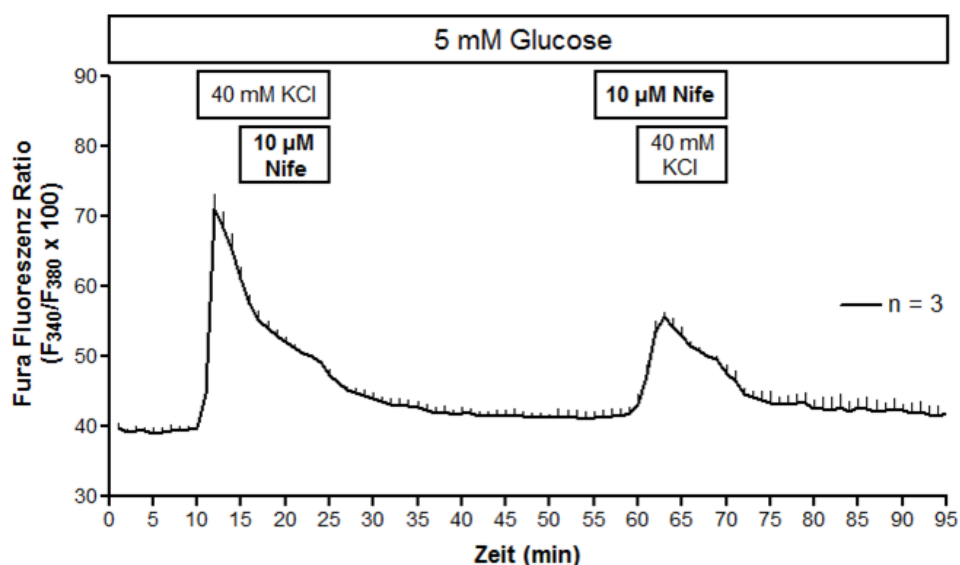
Im Mittelwert bedeutet das für beide Enantiomere eine Steigerung der  $[Ca^{2+}]_i$  um einen Fura-Ratio-Wert von 15. Außerdem entwickelten sich nach einer Latenzzeit von wenigen Minuten leicht wahrnehmbare  $Ca^{2+}$ -Oszillationen. Daraus ergibt sich, dass sowohl das Ausmaß und die Kinetik der  $[Ca^{2+}]_i$  für beide Efaroxan-Enantiomere praktisch identisch waren (siehe **Abbildung 4.22**).

Wie in **Abbildungen 4.18** und **4.19** zu sehen bewirken 40 mM KCl eine deutliche Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erkennbar durch einen starken Anstieg der Fura-Ratio-Werte. Daraufhin sollte untersucht werden, ob ein spezifischer Calcium-Kanalblocker vom L-Typ, Nifedipin, den durch 40 mM KCl induzierten Effekt auf die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration vollständig antagonisieren kann. Dafür wurde die antagonistische Wirkung einmal während einer Exposition mit 40 mM  $K^+$  und einmal mit vorheriger Exposition des Calcium-Kanalblockers mit anschließender KCl-Depolarisation überprüft.

Es wurden frisch isolierte Pankreasinseln der Maus für 95 Minuten in Gegenwart von Krebs-Ringer-Puffer (siehe 3.3.1.1) bei physiologischer Temperatur von 37°C umströmt. In diesem Perifusions-Medium wurden die Inseln für 15 Minuten (Minute 10 bis 25) mit 40 mM  $K^+$  depolarisiert. Ausgehend von einem durchschnittlichen Fura-Ratio-Wert von 39 bewirkte eine 5-minütige Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  einen starken Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bis auf fast das Doppelte (70) des anfänglichen Fura-Ratio-Wertes (siehe **Abbildung 4.23**). Der Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration entspricht den Ergebnissen in **Abbildungen 4.18** und **4.19**. Nach einer 5-minütigen KCl-Expositionszeit wurde die Insel zusätzlich mit 10  $\mu$ M Nifedipin für 10 Minuten (Minute 15 bis 25) umströmt. In Gegenwart von 40 mM KCl bewirkte die gleichzeitige Anwesenheit von 10  $\mu$ M Nifedipin einen progressiven Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  jedoch keinen vollständigen Rückgang zum prästimulatorischen Wert. Das Ausmaß der Wirkung durch Nifedipin lässt sich durch Vergleich mit der alleinigen Wirkung von 40 mM KCl für 10



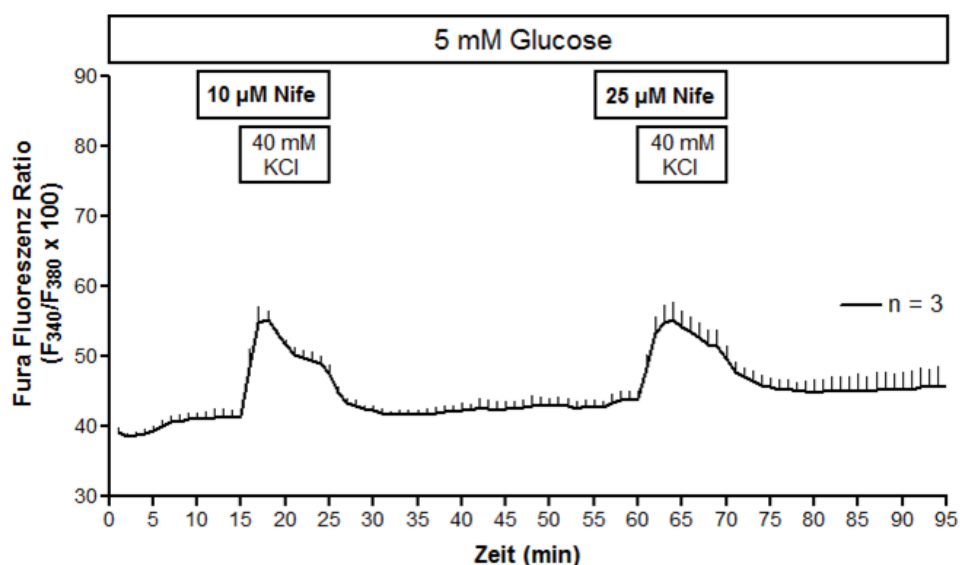
Minuten abschätzen (siehe **Abbildungen 4.18 und 4.19**). Nach Auswaschen von Nifedipin und Absenkung der  $K^+$ -Konzentration auf 5,9 mM entstand eine Basislinie bei Fura-Ratio-Werten von 41. Ab Minute 55 wurden die Inseln mit 10  $\mu$ M Nifedipin für 15 Minuten (Minute 55 bis 70) perfundiert. Nach 5 Minuten in Gegenwart von 10  $\mu$ M Nifedipin, die  $[Ca^{2+}]_i$  blieb anhand gleichbleibender Fura-Ratio-Werten unverändert, wurden die Inseln zusätzlich mit 40 mM KCl für 10 Minuten (Minute 60 bis 70) depolarisiert (siehe **Abbildung 4.23**). Daraufhin stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  an, erkennbar durch einen kurzzeitigen Anstieg der Fura-Ratio-Werte auf 55. Dieser durch 40 mM KCl induzierte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Gegenwart von 10  $\mu$ M Nifedipin ist ebenfalls ohne Ausbildung eines stabilen Plateaus der  $[Ca^{2+}]_i$  geprägt, sondern es folgt nach dem  $Ca^{2+}$ -Peak ein progressiver Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ . Nach Auswaschen des Nifedipins und der erhöhten Kaliumkonzentration (Minute 70 bis 95) wurde der Fura-Ratio-Wert, der vor der Nifedipin-Zugabe bestanden hatte, wieder erreicht.



**Abbildung 4.23** Wirkung von Nifedipin bei gleichzeitiger Anwesenheit von 40 mM KCl auf die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration in pankreatischen Mausinseln.

Eine kultivierte und mit Fura-PE3/AM beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Lösung in Anwesenheit von 5 mM Glucose perfundiert (Minute 0 bis 95). Während einer 15-minütigen Depolarisation mit 40 mM  $K^+$  (Minute 10 bis 25) wurden die Inseln 5 Minuten nach Beginn der  $K^+$ -Depolarisation zusätzlich mit 10  $\mu$ M Nifedipin (Minute 15 bis 25) umströmt. Nach einer 30-minütigen Auswaschphase wurde dem Perfusionsmedium 10  $\mu$ M Nifedipin für 15 Minuten (Minute 55 bis 70) hinzugefügt. Nach einer 5-minütigen Exposition von 10  $\mu$ M Nifedipin wurden die Inseln zusätzlich mit 40 mM  $K^+$  für 10 Minuten (Minute 60 bis 70) perfundiert. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perfusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Versuchen ( $n = 3$ ). Die umströmten Pankreasinseln für dieses Versuchsprotokoll wurden aus einer Präparation gewonnen.

In den nächsten Versuchen sollte überprüft werden, ob eine vorherige Exposition mit einer 2,5-fach höheren Nifedipinkonzentration die antagonistische Wirkung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  deutlicher ausfällt. Dafür wurden frisch isolierte Pankreasinseln der Maus für 95 Minuten in Gegenwart von Krebs-Ringer-Puffer (siehe 3.3.1.1) bei physiologischer Temperatur von 37°C umströmt. Während einer 15-minütigen Anwesenheit von 10  $\mu$ M Nifedipin (Minute 10 bis 25) wurden die Inseln nach 5 Minuten in Gegenwart von 10  $\mu$ M Nifedipin zusätzlich mit 40 mM KCl depolarisiert (siehe **Abbildung 4.24**). Ausgehend von einem durchschnittlichen Fura-Ratio-Wert von 40 bewirkte eine 5-minütige Anwesenheit von 10  $\mu$ M Nifedipin keine Veränderung des Fura-Ratio-Wertes. Erst die zusätzliche Anwesenheit von 40 mM  $K^+$  bewirken einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf einen Fura-Ratio-Wert von 55. Das entspricht den Ergebnissen aus **Abbildung 4.23**. Nach Auswaschen von Nifedipin und Absenkung der  $K^+$ -Konzentration auf 5,9 mM entstand eine Basislinie bei Fura-Ratio-Werten von 42.



**Abbildung 4.24** Wirkung von Nifedipin mit unterschiedlichen Konzentrationen in gleichzeitiger Anwesenheit von 40 mM KCl auf die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration in pankreatischen Mausinseln.

Eine kultivierte und mit Fura-PE3/AM beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Lösung in Anwesenheit von 5 mM Glucose perfundiert (Minute 0 bis 95). Ab Minute 10 wurden die Inseln für 15 Minuten mit 10  $\mu$ M Nifedipin umströmt (Minute 10 bis 25). Nach einer 5-minütigen Exposition von 10  $\mu$ M Nifedipin wurden zusätzlich für 10 Minuten 40 mM  $K^+$  (Minute 15 bis 25) zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Auswaschphase wurde dem Perifusionsmedium 25  $\mu$ M Nifedipin für 15 Minuten (Minute 55 bis 70) hinzugefügt. Nach einer 5-minütigen Exposition von 25  $\mu$ M Nifedipin wurden die Inseln zusätzlich mit 40 mM  $K^+$  für 10 Minuten (Minute 60 bis 70) perfundiert. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Versuchen ( $n = 3$ ). Die umströmten Pankreasinseln für dieses Versuchsprotokoll wurden aus einer Präparation gewonnen.

Ab Minute 55 wurden die Inseln nun mit 25  $\mu\text{M}$  Nifedipin für 15 Minuten (Minute 55 bis 70) perfundiert. Ohne Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  anhand gleichbleibender Fura-Ratio-Werten wurden die Inseln nach 5 Minuten in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  Nifedipin zusätzlich mit 40 mM KCl für 10 Minuten (Minute 60 bis 70) depolarisiert (siehe **Abbildung 4.24**). Daraufhin stieg die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  an, erkennbar durch einen Anstieg der Fura-Ratio-Werte auf 55. Dieser Anstieg, der langsamer als der erste war, zeigte ebenfalls kein stabiles Plateau der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sondern es folgt nach dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak ein progressiver Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Nach Auswaschen des Nifedipins und der erhöhten Kaliumkonzentration (Minute 70 bis 95) wurde fast der Fura-Ratio-Wert, der vor der Nifedipin-Zugabe bestanden hatte, wieder erreicht.

Die 5-minütige Anwesenheit des Calcium-Kanalblockers Nifedipin vor der durch 40 mM KCl induzierten Depolarisation initiierte einen Anstieg der Fura-Ratio-Werte, der nur halb so groß war wie bei einer alleinigen KCl-Depolarisation. In Gegenwart einer 2,5-fach höheren Konzentration von Nifedipin induzierten 40 mM KCl einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak, der nur unwesentlich kleiner war, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass mit 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin eine praktisch maximal effektive Nifedipinkonzentration verwendet wurde und somit ein Teil des Anstiegs der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch nicht Nifedipin-sensitive Mechanismen vermittelt wird.

#### 4.6 Wirkung der Depolarisation auf den cytosolischen pH-Wert

Ausgangspunkt: Die kompensatorische Reduktion der extrazellulären NaCl-Konzentration bei Depolarisation durch Zugabe von 35 mM KCl ermöglicht eine eindeutige und anhaltende Steigerung der Insulinsekretion durch 10 mM Glucose, nicht aber durch 500  $\mu$ M Tolbutamid. An der Stärke der Depolarisation sowohl durch KCl alleine als auch durch KCl bei zusätzlicher Gegenwart von 10 mM Glucose oder 500  $\mu$ M Tolbutamid waren keine Änderungen durch die  $\text{Na}^+$ -Reduktion festzustellen (siehe auch dazu Kapitel 4.4). Insofern war die Hypothese zu prüfen, dass dieser Wiederherstellung der stimulatorischen Wirkung der Glucose ein Mechanismus zugrunde liegt, der einen aktivierten Energiestoffwechsel benötigt und andererseits in Beziehung zur Exozytose steht.

Dafür wurden für eine Stunde frisch isolierte Pankreasinseln der Maus in Gegenwart von Krebs-Ringer-Puffer (siehe 3.1.1.1) bei physiologischer Temperatur von 37°C umströmt und mit Hilfe des Fluoreszenzindikators BCECF der cytosolische pH-Wert  $[\text{pH}]_i$  (siehe auch Kapitel 3.4) gemessen. Ausgehend von einem durchschnittlichen Fluoreszenz-Ratio-Wert von 140 bewirkte eine 10-minütige Anwesenheit von 15 mM  $\text{K}^+$  einen Abfall des BCECF-Ratio-Wertes (133), d.h. es wurde eine Acidifizierung induziert (siehe **Abbildung 4.25**). Nach Absenkung der  $\text{K}^+$ -Konzentration auf 5,9 mM wurden die anfänglichen BCECF-Ratio-Werte wieder knapp erreicht. Es entstand eine Basislinie bei BCECF-Ratio-Werten von 138. Ab Minute 35 wurden die Inseln für 10 Minuten mit 40 mM  $\text{K}^+$  perfundiert. Daraufhin fiel der  $[\text{pH}]_i$  in kurzer Zeit, erkennbar durch einen Abfall des BCECF-Ratio-Wertes mit einer Ausbildung eines steady-state Wertes von 129. Somit war der Acidifizierungsprozess durch 40 mM  $\text{K}^+$  stärker ausgeprägt als der durch 15 mM  $\text{K}^+$  (siehe **Abbildung 4.25**). Mit dem Absenken auf physiologischen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen konnten nach Exposition von 40 mM  $\text{K}^+$  nicht mehr die anfänglichen BCECF-Ratio-Werte erreicht werden und eine weitere Abnahme der Ratio-Werte war erkennbar.

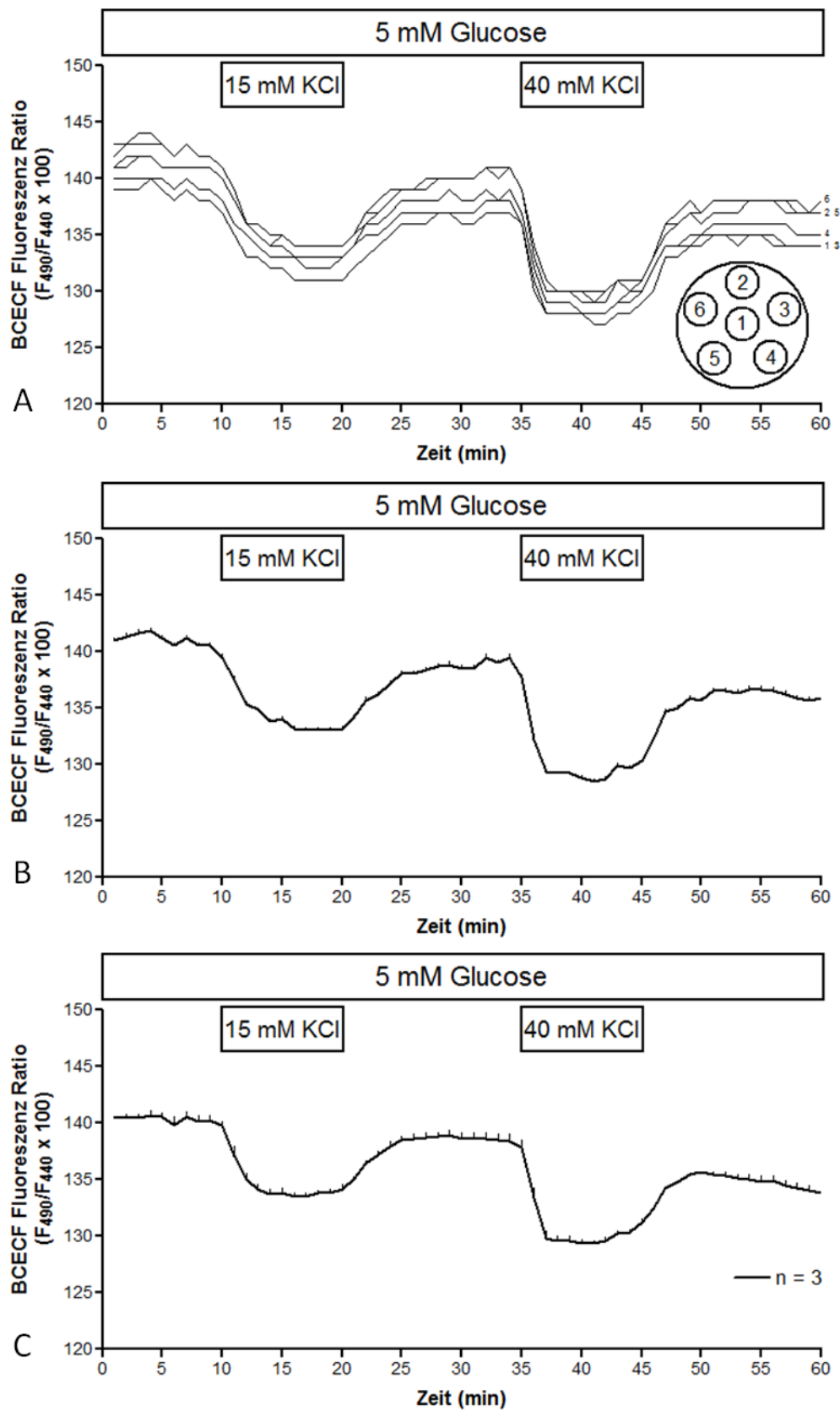


Abbildung 4.25 Beeinflussung des cytosolischen pH-Wertes in pankreatischen Mausinseln durch Erhöhung von  $K^+$  (15 mM und 40 mM) in Anwesenheit einer basalen Glucosekonzentration.

Frisch isolierte Inseln wurden mit Krebs-Ringer-Medium 5 mM Glucose für 60 Minuten perfundiert. Von Minute 10 bis 20 enthielt das Medium 15 mM  $K^+$  und von Minute 35 bis 45 40 mM  $K^+$ . Die BCECF-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perfusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment (A), ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus diesem Einzelexperiment (B) und ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Versuchen ( $n = 3$ ). Die umströmten Pankreasinseln für dieses Versuchsprotokoll wurden aus einer Präparation gewonnen.

In den nachfolgenden Versuchen sollte das Ausmaß der cytosolischen Acidifizierung in Mausinseln durch eine Erhöhung von  $K^+$  (40 mM) in Gegenwart einer kompensatorisch reduzierten  $Na^+$ -Konzentration (105 mM) gemessen werden (siehe **Abbildung 4.26**). Anschließend sollte die Auswirkung auf den  $[pH]_i$  durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM gemessen werden. Dafür wurden frisch isolierte Pankreasinseln der Maus mit Krebs-Ringer-Medium 5 mM Glucose für 30 Minuten perfundiert und anschließend für weitere 30 Minuten die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Ab Minute 10 bis 50 enthielt das Medium 40 mM  $K^+$  und eine kompensatorisch reduzierte Natriumkonzentration (105 mM). Ausgehend von einem durchschnittlichen BCECF-Ratio-Wert von 129 bewirkte die Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration auf 40 mM und gleichzeitig Absenkung der  $Na^+$ -Konzentration um 35 mM nur noch einen marginalen und temporären Abfall des BCECF-Ratio-Wertes (124). D.h., nach 7 Minuten war dieser Acidifizierungseffekt erschöpft und der  $[pH]_i$  normalisierte sich auf anfängliche BCECF-Ratio-Werte (siehe **Abbildung 4.26**). Im restlichen Versuchsverlauf führte eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM zu keiner weiteren Änderung, es lag ein konstanter cytosolischer pH-Wert mit einem BCECF-Ratio-Werte von 125 vor. Auch das Auswaschen der  $K^+$ -Depolarisation bewirkte keine weitere Änderung der BCECF-Ratio-Werte.

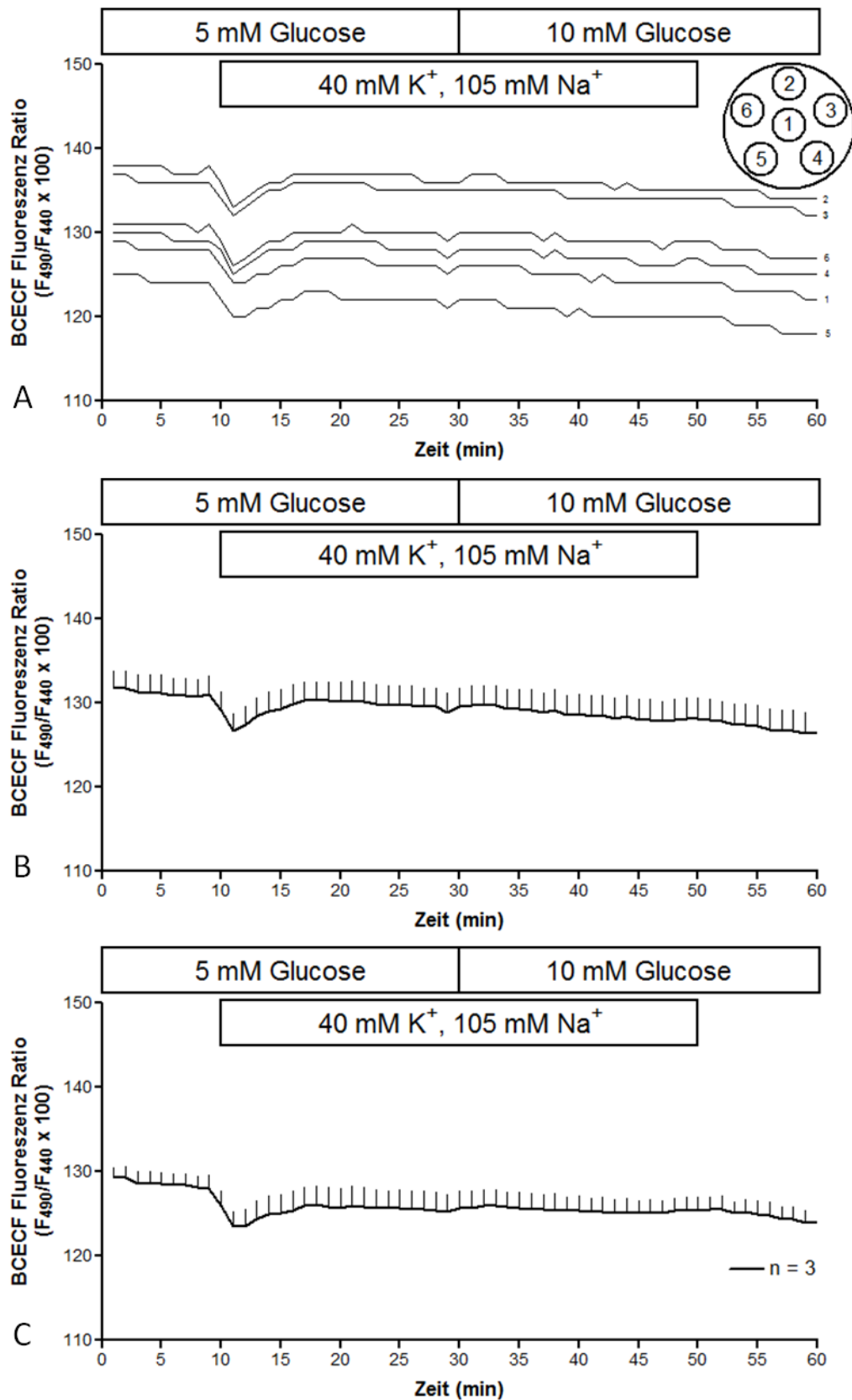


Abbildung 4.26 Beeinflussung des cytosolischen pH-Wertes in pankreatischen Mausinseln durch Erhöhung von K<sup>+</sup> (40 mM) in Gegenwart einer kompensatorisch reduzierten Na<sup>+</sup>-Konzentration (105 mM) und gleichzeitiger Anwesenheit von 5 mM sowie 10 mM Glucose.

Frisch isolierte Inseln wurden mit Krebs-Ringer-Medium 5 mM Glucose für 30 Minuten perfundiert und dann wurde die Glucosekonzentration auf 10 mM für weitere 30 Minuten erhöht. Von Minute 10 bis 50 enthielt das Medium 40 mM  $K^+$  und 105 mM  $Na^+$ . Die BCECF-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment (A), ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus diesem Einzelexperiment (B) und ein Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 Versuchen ( $n = 3$ ). Die umströmten Pankreasinseln für dieses Versuchsprotokoll wurden aus einer Präparation gewonnen.



## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Stimulus-Sekretions-Kopplung der Insulinsekretion, v.a. durch Messung des Membranpotentials und zusätzlich durch Messung der cytosolischen Calciumkonzentration sowie des cytosolischen pH-Wertes untersucht. Der Zweck dieser Untersuchungen war, die Mechanismen einer Kalium-induzierten Insulinsekretion genauer zu verstehen. Dafür sollte beurteilt werden, inwieweit eine Kalium-induzierte Insulinsekretion einer Insulinsekretion entspricht, die durch einen Schluss der ATP-sensitiven Kaliumkanäle eingeleitet wird, wie es der Regelfall bei einer Glucose-induzierten Insulinsekretion ist. Dabei war vor allem das Ziel, folgende Fragen zu beantworten:

1. Warum führen 40 mM KCl, nicht aber 15 mM KCl zu einer starken Insulinsekretionssteigerung?
2. Welche Transportmechanismen bewirken den Calciumeinstrom bei einer durch 15 mM KCl induzierten Depolarisation und welche (zusätzlichen) bei 40 mM KCl?
3. Wie unterscheidet sich der durch  $K_{ATP}$ -Kanalblockade ausgelöste Calciumeinstrom von dem durch 15 bzw. 40 mM KCl ausgelöstem Calciumeinstrom?

Diese Fragen waren entstanden, weil sich in einer größeren Anzahl von Versuchen, bei denen an umströmten frisch isolierten Pankreasinseln der Maus die Kinetik der Insulinsekretion gemessen worden war, Befunde ergeben hatten, die im Rahmen der bisherigen Konsensustheorie der Stimulus-Sekretions-Kopplung nicht zwanglos zu erklären waren.

Im Folgenden soll diskutiert werden, inwieweit die erarbeiteten Ergebnisse diese Fragestellungen beantworten können. Dabei soll in der umgekehrten Reihenfolge vorgegangen werden, da der Komplexitätsgrad der zu betrachtenden Systeme in dieser Reihenfolge zunimmt.

- 1) Wie unterscheidet sich der durch  $K_{ATP}$ -Kanalblockade ausgelöste Calciumeinstrom von dem durch 15 bzw. 40 mM KCl ausgelöstem Calciumeinstrom?

Die Depolarisation der Plasmamembran durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration ist ein etabliertes Verfahren, um eine stimulierte Insulinsekretion hervorzurufen. Typisches Merkmal der Kaliumdepolarisation ist die Ausbildung eines Plateaus, ohne dass dabei Aktionspotentiale auftreten, die bei einer Stimulation mit Glucose zu beobachten sind (Hatlapatka et al. 2009). Die Entstehung des Plateaus wird durch das Nernst-Gleichgewichtspotentials bestimmt und kann mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung unter Berücksichtigung der vorhandenen Elektrolytkonzentrationen und deren Leitfähigkeiten berechnet werden (Hatlapatka et al. 2009). Aber das Auftreten von Aktionspotentialen ist durch einen Calciumeinstrom bekannt, wie er bei Nährstoffstimuli und auch bei pharmakologischen Stimuli der Insulinsekretion, die den  $K_{ATP}$ -Kanal hemmen, entsteht (Rorsman und Trube 1986; Rorsman et al. 1988). Eine elektrische Aktivität in der Beta-Zelle wurde als erstes von Dean und Matthews nachgewiesen (Dean und Matthews 1968), wobei eine Depolarisation in einer Beta-Zelle durch eine stimulatorische Glucosekonzentration ein oszillierendes Verhalten zeigt, das aus dem klassischen „spikes and waves“ Muster besteht (Henquin und Meissner 1984). Eine durch Glucose induzierte Depolarisation entsteht durch die Hemmung eines Kaliumeffluxes (Henquin 1978; Ashcroft et al. 1984). Mit der Identifikation eines Ionenkanals in der Beta-Zellmembran, der von der cytosolischen Seite direkt durch ATP geschlossen wird (Cook und Hales 1984) und dem darauffolgenden Nachweis, dass dieser Kanal auch ein Rezeptor für Sulfonylharnstoffe darstellt (Rorsman und Trube 1985; Sturgess et al. 1985), wurden die „slow waves“ durch das Zustandekommen einer Depolarisation erklärbar. Woraus bestehen aber nun die „spikes“? Schon vor der Identifikation des  $K_{ATP}$ -Kanals wurde die Hypothese aufgestellt, dass Aktionspotentiale oder „spikes“ in der Beta-Zelle die Aktivität von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen widerspiegeln und diese durch Öffnen von spannungsabhängige Kaliumkanäle, wie  $K_v2.1$  und  $Ca^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle, v.a. BK-Kanäle und SK4-Kanäle beendet werden (Smith et al. 1990; Roe et al. 1996; Gopel et al. 1999; Philipson 1999). Die Aktionspotentiale der pankreatischen Beta-Zelle sind durch Phenylalkylamine, wie Verapamil oder D600 (Methoxyverapamil) und durch Dihydropyridine, wie Nifedipin oder Nimodipin vollständig hemmbar, weshalb diese Aktionspotentiale durch spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle bedingt sind (Malaisse-Lagae et al. 1984; Lebrun und Atwater 1985; Rorsman und Trube 1986; Hatlapatka et al. 2009).

Dass dem Calciueinstrom und damit auch der Aktivierung der spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auch bei der Auslösung der Insulinsekretion eine entscheidende Rolle zukommt, zeichnete sich bereits Ende der 70-iger Jahre ab. Auf der einen Seite zeigten Versuche bei einer erhöhten extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine gesteigerte Insulinsekretion (Hellman 1976) und auf der anderen Seite konnte eine Insulinsekretion durch L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker, wie D600 oder nur Nifedipin, gehemmt werden (Malaisse und Boschero 1977; Ohta et al. 1993; Hatlapatka et al. 2011).

Insofern ist es zunächst widersprüchlich, dass bei einer Kaliumdepolarisation, die ebenfalls zu einem Calciueinstrom führt (Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration in der Beta-Zelle durch Fura-PE3/AM messbar, wie z.B. in Hatlapatka et al. 2009 zu sehen) (Hatlapatka et al. 2009), keine Aktionspotentiale ausgelöst werden.

Wie ist also die Abwesenheit von Aktionspotentialen bei einer Kaliumdepolarisation zu erklären? Dieser Sachverhalt ist allgemein bekannt, wenn auch wenig in der Literatur diskutiert. Eine mögliche Erklärung soll im Folgenden dargestellt werden. Die Grundvoraussetzung für das obige Phänomen ist eine hinreichende Kaliumleitfähigkeit, die durch offene  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle, welche den größten Beitrag zur Membranleitfähigkeit der pankreatischen Beta-Zelle liefern (Gopel et al. 1999), gewährleistet wird. Diese Kaliumleitfähigkeit ermöglicht eine Neueinstellung des Gleichgewichtspotentials (wird in Richtung 0 mV verschoben), wenn sich die Kaliumkonzentration extrazellulär erhöht. Daraufhin öffnen spannungsabhängige Calcium-Kanäle, wobei ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom resultiert, der selber depolarisierend wirkt. Dadurch wird der Energieaufwand für den Kaliumefflux geringer und der Kaliumefflux nimmt zu. Konkret heißt das, dass sofort die depolarisierende Wirkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch einen Kaliumefflux kompensiert wird, sodass das Potential möglichst nahe am  $\text{K}^{+}$ -Gleichgewichtspotential bleibt (Willenborg et al. 2011).

Wird nun die Depolarisation durch einen Schluss der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle verursacht, wie es durch eine stimulatorische Glucosekonzentration und durch Sulfonylharnstoffe bewirkt wird, so ist diese Voraussetzung nicht mehr gegeben. Jetzt kann der Calciueinstrom eine weitere Depolarisation bewirken, sodass das Membranpotential theoretisch bis zum Gleichgewichtspotential des Calciums ( $E_{\text{Ca}}$  bei ca. +130 mV) ansteigen könnte. Jedoch wird dieser Anstieg durch zwei Mechanismen begrenzt bzw. rückgängig gemacht a) Inaktivierung der Calciumkanäle nach Öffnen, b) das Öffnen von spannungsabhängigen Kaliumkanäle, wie

K<sub>v</sub>2.1 und Ca<sup>2+</sup>- (und Membranpotential)-abhängige Kaliumkanäle, v.a. BK-Kanäle und SK4-Kanäle (Smith et al. 1990; Roe et al. 1996; Gopel et al. 1999; Philipson 1999). Ob jedoch der Inaktivierung der Calciumkanäle eine regulatorische Funktion zukommt, wird diskutiert (Rorsman und Renstrom 2003; Tsushima 2011).

Diese Mechanismen, die der Beendigung des Aktionspotentials dienen, kommen naturgemäß bei einer Kaliumdepolarisation nicht zustande. Betrachtet man diese Ereignisabfolge lediglich unter der Perspektive, dass sie die Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Exozytose von Insulingranula auslösen soll, so ist dieser Unterschied eigentlich unerheblich. In der letzten Zeit mehren sich jedoch die Hinweise, dass Ionenkanäle über die Ionenleitung hinaus zusätzliche Funktionen bei der Regulation der Insulinsekretion besitzen. Diskutiert wird ein solches Verhalten v.a. für den spannungsabhängigen Kaliumkanal K<sub>v</sub>2.1 (MacDonald und Wheeler 2003; Feinshreiber et al. 2009) und auch für den spannungsabhängigen Calciumkanal Ca<sub>v</sub>1.2 (Atlas 2010). Insofern könnte das Ausbleiben von Aktionspotentialen durchaus zu einem unterschiedlichen Charakteristikum der Insulinsekretion führen im Vergleich durch die prinzipiell gleichartigen Kaliumdepolarisation ausgelösten Insulinsekretion.

Trotz allem ist zu fordern, dass eine Verminderung der K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit, z.B. durch einen Sulfonylharnstoff, während einer Kaliumdepolarisation zu einem Erscheinen von Aktionspotentialen führen müsste. Und in der Tat zeigen sich diese bei einer Depolarisation mit 15 mM KCl, nicht jedoch bei einer durch 40 mM KCl induzierten Depolarisation. Hiermit ergab sich ein erneutes Problem, denn 15 mM KCl allein steigert die Insulinsekretion nur sehr gering und das auch nur für 5 bis 10 Minuten. 40 mM KCl hingegen ist die Konzentration, die typischerweise verwendet wird, um eine starke erstphasenartige Insulinsekretion auszulösen. Dabei zeigten auch Messungen mit dem Indikator Fura-PE3/AM, dass 40 mM KCl zu einem schnellen und starken Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration führen (Hatlapatka et al. 2009).

Um das Problem der fehlenden Aktionspotentiale bei einer Depolarisation von 40 mM KCl anzugehen, wurde eine genauere Charakterisierung des Phänomens durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein progredienter Verlust der Aktionspotentialamplitude entsteht, wenn in Gegenwart von 500 µM des K<sub>ATP</sub>-Kanal-blockierenden Sulfonylharnstoffs Tolbutamid die Kaliumkonzentration schrittweise von 15 auf 40 mM angehoben wird (siehe Abbildung 4.3).

Die restliche Kaliumleitfähigkeit, die nicht durch das Tolbutamid blockiert, aber möglicherweise durch eine stärkere Depolarisation durch 40 mM KCl aktiviert wird (d.h. spannungsabhängige- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle), ist jedoch nicht entscheidend für das Fehlen von Aktionspotentialen, weil auch in der Anwesenheit des unspezifischen Kalium-Kanalblockers TEA keine Aktionspotentiale erscheinen (siehe Abbildung 4.4). Andererseits haben 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin unter diesen Bedingungen nur eine geringe repolarisierende Wirkung ( $1,50 \pm 0,39$  mV,  $n = 4$ ), während das Verschwinden der Aktionspotentiale durch Nifedipin einer Repolarisation um ca. 20 mV gleichkommt (Hatlapatka et al. 2009). Das heißt, dass entweder die Art des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms verändert ist oder Nifedipin erleidet einen Wirkungsverlust unter den gegebenen Bedingungen. Diese Hypothese wurde genauer untersucht, indem als indirekter quantitativer Parameter die repolarisierende Wirkung von Nifedipin mit derjenigen von Cobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) verglichen wurde. Die Begründung dafür ist, dass mit einem unspezifischen Blocker,  $\text{CoCl}_2$ , eine möglichst große Breite der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom-Mechanismen blockiert werden und das weitestgehend unabhängig von den Mechanismen, die zur Öffnung geführt haben. Auch in früheren Untersuchungen ist  $\text{CoCl}_2$  als pharmakologisches Werkzeug verwendet worden, um die Insulinsekretion zu hemmen (Henquin 1980). In der Tat ließ sich ein Unterschied zwischen der repolarisierenden Wirkung von Nifedipin und derjenigen von  $\text{CoCl}_2$  erkennen.  $\text{CoCl}_2$  wirkte sowohl bei einer Depolarisation durch 15 als auch mit 40 mM KCl stärker repolarisierend. Insofern schien die Vermutung bestätigt, dass es außer den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen noch weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom-Mechanismen geben müsse, die bei einer Kaliumdepolarisation zu einer Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verbunden mit einer gesteigerten Exozytose führen. Da zudem der repolarisierende Effekt von  $\text{CoCl}_2$  in Anwesenheit von 40 mM KCl signifikant stärker war als der bei der Exposition von 15 mM KCl und hingegen der repolarisierende Effekt durch Nifedipin nicht signifikant verändert war, so stellte sich die Frage, ob möglicherweise der starke insulinotrope Effekt durch 40 mM KCl (Hatlapatka et al. 2009) auf diesen anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zurückzuführen sei. Da aber in der Literatur eine praktisch vollständige Hemmung des Depolarisations-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch Dihydropyridine berichtet wird (Schulla et al. 2003; Gopel et al. 2004), wurde als Kontrollversuch die Wirkung von Nifedipin auf Aktionsströme untersucht, die mittels der Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus erzeugt wurden. Typischerweise wird hierzu die Kaliumleitfähigkeit in der Plasmamembran der Beta-Zelle minimiert, indem mittels eines

Sulfonylharnstoffs, wie hier mit Glipizid, die  $K_{ATP}$ -Kanäle und mittels TEA die spannungs- und  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle blockiert werden. Das eigentliche Auslösen des  $Ca^{2+}$ -Einstroms wurde dann durch einen Depolarisationspuls von 10 mV Amplitude und 200 ms Dauer induziert, ausgehend von einem Haltepotential von -50, -40 oder -30 mV (siehe Abbildung 4.10). Der Grund für die Auswahl dieses Depolarisationsprotokolls war eine bessere Annäherung an das charakteristische „spike und wave“ Muster einer Beta-Zelle als im Vergleich zum üblichen Protokoll für spannungsabhängige Kanäle, das zunehmende Amplituden ausgehend von einem Haltepotential in der Nähe des Ruhemembranpotentials (ca. -70 mV) vorsieht. Während nun bei einem Haltepotential von -50 mV Aktionsströme nur als getriggerte Antwort auf die Depolarisationspulse zu sehen waren, so waren bei -40 und -30 mV neben getriggerten auch spontane Aktionsströme zu erkennen.

Die getriggerten Ströme ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wiesen die gleichen maximalen Stromstärken ( $60,7 \pm 5,9$  pA,  $n = 6$ ) auf wie die Aktionsströme, die bei einer Depolarisation von -70 auf -30 mV in Beta-Zellen registriert wurden (Gopel et al. 1999). Interessanterweise war die Stromamplitude bei stärker depolarisiertem Haltepotential geringer und zudem nahm die Frequenz der spontanen Aktionsströme bei einer weiteren Erhöhung des Haltepotentials von -40 auf -30 mV stark ab. Nimmt man nun an, dass der  $Ca^{2+}$ -Einstrom proportional zur Fläche der Aktionsströme ist, so bedeutet das, dass der  $Ca^{2+}$ -Einstrom bei stärkerer dauerhafter Depolarisation als -40 mV deutlich abnimmt. Ein solches Verhalten war bei der Messung unterschiedlich starker Kaliumdepolarisationen nicht zu erkennen, sofern man den Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration (gemessen mit Fura-PE3/AM) zwar nicht als proportionalen, aber dennoch monoton steigenden Ausdruck des  $Ca^{2+}$ -Einstroms auffasst (Willenborg et al. 2012). Insofern stellte sich bereits bei der Betrachtung dieses Sachverhalts die Frage, ob dem  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch Strominjektion im Voltage-Clamp-Modus die gleichen Mechanismen zugrunde liegen wie bei einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch Kaliumdepolarisation. Die zweite Beobachtung, die zu dieser Frage führte, ist, dass Nifedipin genauso effektiv wie  $CoCl_2$  sowohl die getriggerten Aktionsströme als auch die durch das Haltepotential bewirkten spontanen Aktionsströme auslöscht. Diese Beobachtung entspricht der beobachteten Wirkung von Nifedipin bei Verwendung konventioneller Stimulationsprotokolle (Depolarisationsschritte von -70 bis 0 mV), nur ist diese aber in offenkundigem Widerspruch zu dem schwächer repolarisierenden Effekt durch Nifedipin verglichen mit der durch  $CoCl_2$ . Zudem war nur der Effekt von  $CoCl_2$  und nicht

derjenige von Nifedipin abhängig von der Kaliumkonzentration. Gibt es also zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom-Mechanismen, die nur durch  $\text{CoCl}_2$ , nicht aber durch Nifedipin blockiert werden und durch die 40 mM KCl, nicht aber durch 15 mM KCl eine massive Insulinsekretion auslösen?

In kombinierten Messungen des Membranpotentials sowie Aktionsströmen, die nach Abschluss der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, war zu beobachten, dass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, wenn sie zusätzlich in Gegenwart von Tolbutamid und TEA durchgeführt wurde, zu einer Veränderung der durch  $\text{K}^+$ -Kanalblockade induzierten Aktionsströme führte.

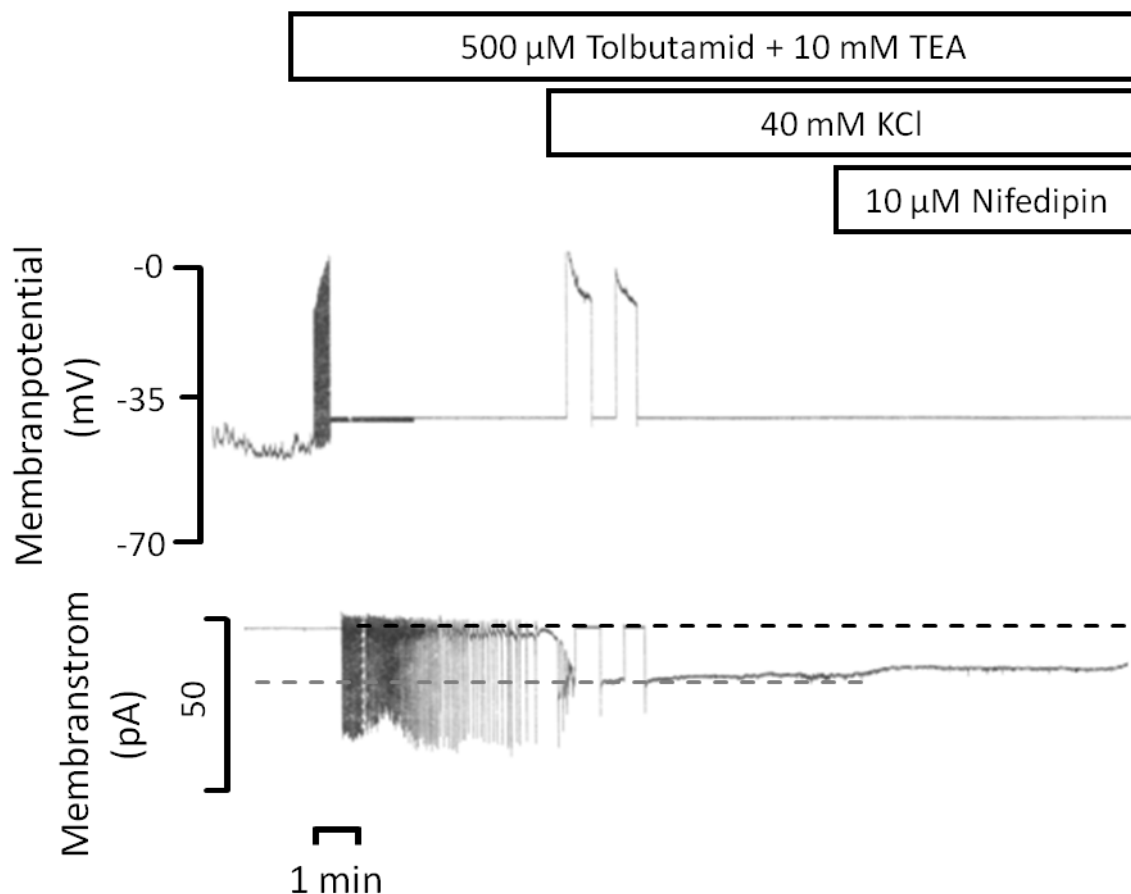


Abbildung 5.1 Transformation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionsströmen durch 40 mM KCl im Voltage-Clamp-Modus in einer Beta-Zelle (Willenborg et al., unveröffentlichte Beobachtung)

In der Beta-Zelle wurden  $\text{K}^+$ -Ströme durch gleichzeitige Anwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid und 10 mM TEA blockiert und das Haltepotential auf -40 mV eingestellt. Die Zugabe von 40 mM KCl transformierte das zuvor hergestellte „Einwärts-spiking“ in einen kontinuierlichen Einwärtsstrom mit einer Amplitude ähnlich den verformten Aktionsströmen (gepunktete graue Linie). Dieser Strom wurde nur leicht von 10  $\mu\text{M}$  Nifedipin reduziert. Originalregistrierung ist repräsentativ für 4 Experimente.

Bei 15 mM KCl traten eine Verminderung sowie eine Verbreiterung der Amplitude ein. Im Vergleich dazu wurde bei 40 mM KCl das Aktionspotentialmuster nach einer kurzen Übergangsperiode mit verbreiterten und verminderten Aktionsströmen von einem kontinuierlichen Einwärtsstrom abgelöst. Es scheint also, dass im Unterschied zu einer dauerhaften Depolarisation durch eine Strominjektion (Voltage-Clamp-Modus) auf -40 mV eine vergleichbare starke KCl-Depolarisation die Art des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms verändert. Möglicherweise kommt der dauerhafte Einwärtsstrom durch einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zustande, der die starke erstphasenartige Insulinsekretion bewirkt. Solche Änderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms werden aber nicht durch 15 mM KCl bewirkt. Somit lässt sich weiterhin fragen, ob der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch einen physiologischen Stimulus, vermittelt durch eine Hemmung des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals, tatsächlich hinreichend ist, eine erste Phase der stimulierten Insulinsekretion auszulösen (Rorsman und Renstrom 2003; Tsushima 2011).

Ein weiterer Themenbereich im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit ist die Rolle der kompensatorischen Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration bei der Kaliumdepolarisation. Diese Kompensation wird von vielen Arbeitsgruppen als gute Praxis angesehen um bei einer Erhöhung der Kaliumkonzentration (typischerweise durch KCl-Zugabe) die Isoosmolarität konstant zu halten (typischerweise durch geringere NaCl-Einwaage) (Dryselius et al. 1999). Es hatte sich nun in vorangegangenen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass es bei länger andauernden Kaliumdepolarisation zu einer deutlichen Abnahme der sekretorischen Responsivität der Beta-Zellen kommt (Hatlapatka et al. 2009), was bei ähnlichen Versuchsprotokollen von anderen Arbeitsgruppen nicht festgestellt worden war (Straub und Sharp 2004; Geng et al. 2007). Daher war die Frage naheliegend, ob möglicherweise die kompensatorische Natriumreduktion für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich gemacht werden kann. Es ließ sich in der Tat zeigen, dass bei einer kompensatorischen Natriumreduktion die progressive Abnahme der Sekretionsfähigkeit ausblieb, wofür allerdings nicht die Isoosmolarität verantwortlich war (Willenborg et al. 2011). Zudem war dieser Effekt nur bei einer stimulatorischen Glucosekonzentration, nicht jedoch bei einem pharmakologischen Block der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle sichtbar. Darum wurde geprüft, ob sich die stimulierenden Wirkungen von Glucose und dem  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalblocker Tolbutamid auf das Membranpotential von Beta-Zellen unterscheiden, wenn bei einer starken Depolarisation (40 mM KCl) die Natriumkonzentration unverändert oder kompensatorisch vermindert ist. Die kompensatorische Natriumreduktion hatte jedoch



weder eine Auswirkung auf die durch KCl induzierte Depolarisation an sich, noch hatte sie eine Auswirkung auf die geringe zusätzliche Depolarisation, die durch Glucose oder Tolbutamid zusätzlich zu der auf konstantem Niveau verbleibenden  $K^+$ -Depolarisation bewirkt wurde. Daher sind Mechanismen anzunehmen, die nicht direkt in die „klassische“ (bzw. „triggering“) Abfolge der Stimulus-Sekretions-Kopplung der Beta-Zelle involviert sind (siehe unten). Zudem fiel in der Auswaschphase ein Phänomen auf, das einer weiteren Untersuchung bedarf. Wurde nämlich die erhöhte Kaliumkonzentration ausgewaschen, entstand trotz der Anwesenheit einer maximal wirksamen Tolbutamidkonzentration oder einer stimulatorisch wirksamen Glucosekonzentration eine Repolarisation. Bei 40 mM KCl war sie ausgeprägter (z.T. praktisch bis zum Ruhemembranpotential) und längerdauernd (bis zu 5 Minuten) als im Vergleich bei 15 mM KCl. Auch bei kompensatorischer Reduktion der  $Na^+$ -Konzentration trat dieses Phänomen auf, allerdings in abgeschwächter Form. Die naheliegende Erklärung ist, dass sich durch die  $K^+$ -Depolarisation, wie bei einem Aktionspotential, spannungs- und  $Ca^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle geöffnet haben. Allerdings wird dieser Kaliumleitfähigkeit zumeist nur die Funktion zugeschrieben, ein Aktionspotential zu beenden, nicht jedoch eine vollständige Repolarisation bis auf ein Niveau, welches dem Ruhemembranpotential entspricht. Hierfür soll nach Meinung mehrerer Gruppen eine vermehrte Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle verantwortlich sein (Detimary et al. 1998; Kanno et al. 2002; Rorsman et al. 2011). Insofern ist hier eine weitere Charakterisierung der zugrundeliegenden Leitfähigkeiten und der Bedingungen ihrer Entstehung angebracht.

Die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration ergab sich als Konsequenz aus den hervortretenden Diskrepanzen zwischen der mäßig starken Depolarisation mit 15 mM KCl und der durch 40 mM KCl starken Depolarisation. Da in einer früheren Publikation beschrieben worden war, dass, wenn nach einer längeren Expositionszeit mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Imidazolin Efaroxan zusätzlich 40 mM KCl zugegeben wurde, ein weiterer Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Beta-Zellen zu verzeichnen war (Hatlapatka et al. 2009), so sollte jetzt mit einem ähnlichen Protokoll die Wirkung von 15 und 40 mM KCl bei einer möglichst vollständigen Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle verglichen werden. Die Erwartung dabei war, dass 15 mM KCl, eine Depolarisation auslöst, die größenordnungsgemäß ungefähr dem Plateau bei einem  $K_{ATP}$ -Kanalblock entspricht (d.h. die Amplitude der „slow waves“ ohne überlagerte  $Ca^{2+}$ -Spikes), keinen weiteren Anstieg der

cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslösen würden. Hingegen wurde von 40 mM KCl erwartet, dass sich der Vorbefund ebenfalls mit einer weiteren Steigerung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestätigen lasse, auch wenn statt des Imidazolins Efaroxan der besser charakterisierte Sulfonylharnstoff Tolbutamid als  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalblocker verwendet wurde. Überraschenderweise induzierten aber sowohl 40 als auch 15 mM KCl einen zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak, der mit Auswaschen in Gegenwart von Tolbutamid reversibel war. Wie lässt sich nun dieser additive Effekt, v.a. durch 15 mM KCl, erklären? Möglicherweise wirkt die erhöhte extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration nicht nur durch die Depolarisation, d.h. durch die Verschiebung des Nernst-Gleichgewichtspotential, sondern beeinflusst auch das Antwortverhalten der Zellmembran auf die Depolarisation. Es zeigte sich nämlich in kürzlich durchgeführten Versuchen, dass sich bei Anwesenheit einer erhöhten  $\text{K}^+$ -Konzentration die durch Tolbutamid und TEA induzierten Aktionspotentiale in Breite und Amplitude veränderten (Willenborg et al., unveröffentlichte Beobachtung). Des Weiteren wurde durch Messungen der Insulinsekretion gezeigt, dass sowohl der durch 15 als auch von 40 mM  $\text{K}^+$  induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zu einer deutlichen Erhöhung (ungefähr Verdoppelung) zu der durch Tolbutamid bereits schon stimulierten Sekretion führen kann.

Da der durch eine Depolarisation ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ fließt (Rorsman et al. 1988; Dunne et al. 1994), so sollte dieser durch spezifische Blocker, wie Nifedipin, hemmbar sein. Tatsächlich konnte ich beobachten, dass die Aktionsströme, die durch Depolarisation bei gleichzeitiger Kalium-Kanalblockade (d.h. durch Tolbutamid plus TEA) bewirkt wurde, durch Nifedipin vollständig aufgehoben wurden (siehe Abbildung 4.10). Allerdings war früher beobachtet worden, dass eine durch 40 mM KCl ausgelöste Steigerung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur unvollständig durch Nifedipin antagonisierbar war (Hatlapatka et al. 2011). Diese Beobachtung lässt die Interpretation zu, dass andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromwege existieren und/oder eine cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (evtl. aus dem ER oder Mitochondrien) zustande kommt. Vor einer weiteren Befassung mit dieser Thematik sollte jedoch die Befundlage durch weitere Experimente gesichert werden. Es zeigte sich nämlich, dass auch bei vorheriger Exposition mit Nifedipin ein Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu verzeichnen war (siehe Abbildung 4.23 und 4.24). Dieser war zwar gegenüber der Kontrolle, d.h. bei einer reinen Depolarisation mit 40 mM  $\text{K}^+$ , deutlich vermindert (Halbierung), wurde jedoch selbst bei einer 2,5 fachen Erhöhung der Nifedipinkonzentration (25  $\mu\text{M}$ ) nicht wesentlich verändert.

Dieser Befund könnte erklären, warum die Arbeitsgruppe von Ohta (Ohta et al. 1993) zwar eine vollständige Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch eine vorherige Nifedipin-Exposition gefunden hatte, jedoch nur eine unvollständige Hemmung der durch 40 mM KCl induzierten Insulinsekretion. Der Mechanismus, der dieser Steigerung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zugrunde liegt, könnte durchaus in einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bestehen. Die Arbeitsgruppe um Roe (Roe et al. 1993) hatte beschrieben, dass eine KCl-Depolarisation eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung initiiert, die nicht vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die Plasmamembran abhängig ist. Eine ähnliche Befundkonstellation ergab sich auch kürzlich, als die Rolle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms für die Desensibilisierung der Insulinsekretion untersucht wurde. Denn, obwohl die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch EGTA auf ca. 0,1 mM reduziert worden war, kam es zu einem sofortigen Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und daraus resultierenden Steigerung der Insulinsekretion (Willenborg et al. 2012).

Um die unerwarteten Befunde der Beeinflussung der Aktionsströme durch hohe Kaliumkonzentrationen besser zu erklären, wurden Auswirkungen des cytosolischen pH-Wertes durch eine Kaliumdepolarisation sowie bei einer kompensatorischen Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration bei entsprechender Kaliumdepolarisation untersucht. Denn es wird spekuliert, dass Protonen ( $\text{H}^+$ ), die nach der Metabolisierung der Glucose entstehen, eine Änderung des cytosolischen pH-Wertes bewirken, bestimmte Schritte der Stimulus-Sekretion-Kopplung beeinflussen (Malaisse et al. 1984). So ist z.B. ein Schlüsselenzym der Glykolyse, die Phosphofructokinase, sehr pH-empfindlich (Ui 1966) und zudem können pH-Änderungen Auswirkungen auf das Membranpotential sowie dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss durch Einfluss auf  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle und spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle haben (Misler et al. 1989). Unter physiologischen Bedingungen, wie es bei Anwesenheit einer stimulatorischen Glucosekonzentration der Fall ist, wird eine leichte Alkalisierung des Interzellularraums der Beta-Zelle induziert (Juntti-Berggren et al. 1994). Die genauen mechanistischen Grundlagen, die das Auftreten des Alkalisierungsprozesses erklären, sind noch nicht vollständig geklärt. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch KCl der cytosolische pH-Wert acider wird und daraus das Verhalten von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom physiologischen abweichen könnte. So könnte die Exposition von 15 oder 40 mM KCl aufgrund des Acidifizierungseffektes des Cytosols eine veränderte Kanalaktivität entstehen, wie z.B. eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -

Kanäle und somit zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen (Saegusa et al. 2011). Durch die Verwendung von 40 mM  $\text{K}^{+}$  unter isoosmolaren Bedingungen, d.h. durch eine kompensatorische Natriumreduktion, konnte hingegen der Acidifizierungseffekt vermindert werden. Und anhand der uns bekannten Sekretionsdaten unter denselben Bedingungen wurde eine dauerhafte gesteigerte Sekretionsantwort in Anwesenheit eines Stimulus bewirkt, die bei Bedingungen ohne korrigierter Natriumkonzentration nicht zu sehen waren, sodass der cytosolische pH-Wert an der Insulinsekretion gekoppelt sein kann. Es ist also wahrscheinlich, dass der cytosolische pH-Wert  $[\text{pH}]_i$  einen Einfluss auf die Insulinsekretion hat, was bei der Auswahl und Bewertung der Stimulationsprotokolle zu berücksichtigen ist.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Depolarisation in der Auslösung der stimulierten Insulinsekretion geprüft werden. Es ist derzeit allgemein anerkannt, dass der physiologische Hauptstimulus, die Glucose, die Sekretion über eine Depolarisation der Plasmamembran bewirkt und zudem noch weitere, bisher noch nicht verstandenen Signale produziert, die zu einer Verstärkung der durch die Depolarisation ausgelösten Insulinsekretion führen. Deshalb wird die Depolarisation der Beta-Zellplasmamembran als Triggersignal bezeichnet, die noch unbekannten Verstärkersignale als amplifizierende Signale.

Für die Erforschung der amplifizierenden Signale sind derzeit Versuchsprotokolle etabliert, in denen die Sekretion zunächst über einen rein depolarisierenden Stimulus ausgelöst und dann der Stoffwechsel der Glucose bzw. anderer Stimuli mit Nährstoffcharakter moduliert wird. Dabei gibt es die Vorstellung, dass der Sekretionsanstieg, der über den durch Depolarisation bewirkten hinausgeht, den amplifizierenden Signalen zuzurechnen ist. Die Depolarisation wird in solchen Versuchen entweder durch eine Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals bewirkt oder aber über eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, wobei zur Sicherstellung einer ausreichenden Kaliumleitfähigkeit häufig auch noch der Kalium-Kanalöffner Diazoxid hinzugesetzt wird.

In vorangegangenen Untersuchungen sind nun Befunde erhoben worden, die daran zweifeln lassen, ob die Insulinsekretion durch Kaliumdepolarisation tatsächlich als das Äquivalent des Anteils der Glucose-induzierten Insulinsekretion gelten kann, der durch die Depolarisation der Plasmamembran bewirkt wird. Insofern waren die Mechanismen der Kaliumdepolarisation an der Beta-Zelle der Maus erneut zu prüfen. Hierfür wurde das Plasmamembranpotential isolierter Pankreasinseln mit der Patch-Clamp-Technik in der perforated-patch Konfiguration und der klassischen whole-cell Konfiguration gemessen. Zudem wurde für einige Versuchsanordnungen noch die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration und der pH-Wert mittels der Fluoreszenzindikatoren Fura-PE3/AM bzw. BCECF-AM gemessen.

Ein bekannter Befund, der die Depolarisation durch Kalium von derjenigen durch Hemmung des Kaliumeffluxes (Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals) unterscheidet ist, dass es bei der Kaliumdepolarisation nicht zu Aktionspotentialen der Beta-Zelle kommt. Unerwarteterweise

fehlen die Aktionspotentiale aber auch, wenn in Gegenwart von 40 mM  $K^+$  der Kaliumefflux durch einen Blocker des  $K_{ATP}$ -Kanals wie Tolbutamid oder Glipizid vermindert wird. Bei einer mäßigen Depolarisation mit 15 mM  $K^+$  treten sie bei  $K_{ATP}$ -Blockade jedoch zum Vorschein. Da die Aktionspotentiale der Beta-Zelle durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom zustande kommen, weist dieser Befund darauf hin, dass es mechanistische Unterschiede zwischen dem  $Ca^{2+}$ -Einstrom gibt, der durch 15 mM KCl hervorgerufen wird und demjenigen, der durch 40 mM KCl hervorgerufen wird. Tatsächlich ist die Repolarisation, die durch die Blockade des Depolarisations-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom hervorgerufen wird, bei 40 mM  $K^+$  signifikant stärker als bei 15 mM  $K^+$ , wobei der unspezifische Inhibitor  $CoCl_2$  signifikant stärker wirkte als der spezifische Hemmstoff von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen, Nifedipin, in einer maximal wirksamen Konzentration. Zudem nahm der nicht Nifedipin-hemmbarer Anteil bei 40 mM  $K^+$  stark zu. Insofern erklärt sich der Befund, dass Nifedipin auch bei Vorbehandlung nicht in der Lage ist, den cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg durch 40 mM  $K^+$  vollständig zu unterdrücken. Insofern stellte sich die Frage, ob der starke insulinotrope Effekt, den 40 mM  $K^+$ , nicht aber 15 mM  $K^+$  besitzt, durch einen anderen  $Ca^{2+}$ -Einstrom zustande kommt als durch denjenigen über L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Interessanterweise war bei Verwendung eines Voltage-Clamp-Stimulationsprotokolls mit Physiologie-nahem Stimulationsmuster (hyper- und depolarisierende Schritte von 10 mV, ausgehend von Haltepotentialen von -50, -40 und -30 mV) nur ein Aktionsstrom zu sehen, der sich vollständig durch Nifedipin hemmen ließ. Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass eine Depolarisation durch eine extrazelluläre hohe Kaliumkonzentration sich in ihren Effekten von einer Depolarisation mittels Strominjektion unterscheidet. Tatsächlich konnten spätere Versuche in der Arbeitsgruppe eine Verbreiterung der Aktionsströme durch Erhöhung der Kaliumkonzentration bis zum Übergang in einen kontinuierlichen Einwärtsstrom bei 40 mM  $K^+$  zeigen. Die Hypothese, dass eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration nicht nur einen spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanal aktiviert, sondern ihn auch qualitativ im Sinne eines  $Ca^{2+}$ -Kanal-öffnenden Effekts länger offen hält, wird durch den Befund bestätigt, dass 15 mM  $K^+$  in der Lage ist, in Gegenwart von einer vollständigen  $K_{ATP}$ -Kanal-Blockade (durch 500  $\mu$ M Tolbutamid) noch weiter die cytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu steigern, obwohl die depolarisierende Stärke nicht höher ist als die des  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocks.

Weitere Versuche betrafen die Frage, wie sich die von einigen Gruppen praktizierte kompensatorische Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration auf den

längerfristigen Verlauf der Kaliumdepolarisation auswirkt. Hier war der konkrete Anlass die Beobachtung, dass eine solche Reduktion der  $\text{Na}^+$ -Konzentration die sekretorische Wirksamkeit von Stimuli mit Nährstoffcharakter in der andauernden Gegenwart einer Kaliumdepolarisation wiederherstellte, nicht jedoch die sekretorische Wirksamkeit von zusätzlich depolarisierenden Stimuli. Hier führten die Messungen des Membranpotentials zu der Beobachtung, dass die wiederhergestellte insulinotrope Wirkung von 10 mM Glucose nicht durch einen zusätzlichen depolarisierenden Effekt erklärt werden kann. Interessant und in späteren Untersuchungen weiter zu verfolgen ist die Beobachtung, dass nach längerdauernder Depolarisation mit 40 mM  $\text{K}^+$  das Auswaschen der erhöhten  $\text{K}^+$ -Konzentration zu einer z.T. vollständigen Repolarisation führte, obwohl weiterhin Blocker von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen und zusätzlich unspezifische Kaliumkanalblocker anwesend waren.

Insgesamt scheinen die Mechanismen, mit denen die Kaliumdepolarisation eine Insulinsekretion auslöst, komplexer zu sein als bisher angenommen. Zunächst hat die häufig routinemäßig durchgeführte kompensatorische Reduktion der Natriumkonzentration, die die Isoosmolarität des Inkubationsmediums wahren soll, eigene Effekte auf die Nährstoff-induzierte Insulinsekretion ausübt. Dann scheint der Effekt der Kaliumdepolarisation sich nicht in einer Depolarisation der Plasmamembran und dadurch begründbaren Effekten auf spannungsabhängige Ionenkanäle zu erschöpfen. Es kommt bei hohen Kaliumkonzentrationen zu einer qualitativen Änderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, möglicherweise durch eine Verminderung des cytosolischen pH-Wertes bedingt. Somit stellt sich die Frage, inwieweit solche Kaliumdepolarisationen, die bei einer basalen Glucosekonzentration eine Insulinsekretion hervorrufen können, tatsächlich physiologische Ereignisse in der Glucose-induzierten Insulinsekretion imitieren und als pharmakologische Werkzeuge in der weiteren Erforschung der Stimulus-Sekretions-Kopplung brauchbar sind.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Ghani, M. A., D. Tripathy, et al. (2006). "Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose." Diabetes Care **29**(5): 1130-1139.
- Alberti, K. G. und P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." Diabet Med **15**(7): 539-553.
- Allen, C. N., E. S. Harpur, et al. (1990). "Efflux of bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF) by a novel ATP-dependent transport mechanism in epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **172**(1): 262-267.
- Ashcroft, F. M. und F. M. Gribble (1999). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease." Diabetologia **42**(8): 903-919.
- Ashcroft, F. M., D. E. Harrison, et al. (1984). "Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells." Nature **312**(5993): 446-448.
- Ashcroft, F. M. und P. Rorsman (1989). "Electrophysiology of the pancreatic beta-cell." Prog Biophys Mol Biol **54**(2): 87-143.
- Atlas, D. (2010). "Signaling role of the voltage-gated calcium channel as the molecular on/off-switch of secretion." Cell Signal **22**(11): 1597-1603.
- Boens, N., W. Qin, et al. (2006). "Photophysics of the fluorescent pH indicator BCECF." J Phys Chem A **110**(30): 9334-9343.
- Bokvist, K., L. Eliasson, et al. (1995). "Co-localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells." EMBO J **14**(1): 50-57.
- Butler, A. E., J. Janson, et al. (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." Diabetes **52**(1): 102-110.
- Cnop, M., N. Welsh, et al. (2005). "Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities." Diabetes **54 Suppl 2**: S97-107.
- Cook, D. L. und C. N. Hales (1984). "Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells." Nature **311**(5983): 271-273.
- Coore, H. G. und P. J. Randle (1964). "Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro." Biochem J **93**(1): 66-78.
- Curry, D. L., L. L. Bennett, et al. (1968). "Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas." Endocrinology **83**(3): 572-584.



- Dean, P. M. und E. K. Matthews (1968). "Electrical activity in pancreatic islet cells." Nature **219**(5152): 389-390.
- DeFronzo, R. A. (1988). "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM." Diabetes **37**(6): 667-687.
- Del Prato, S. (2003). "Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia." Diabetologia **46 Suppl 1**: M2-8.
- Detimary, P., P. Gilon, et al. (1998). "Interplay between cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets." Biochem J **333 ( Pt 2)**: 269-274.
- Detimary, P., J. C. Jonas, et al. (1995). "Possible links between glucose-induced changes in the energy state of pancreatic B cells and insulin release. Unmasking by decreasing a stable pool of adenine nucleotides in mouse islets." J Clin Invest **96**(4): 1738-1745.
- Dryselius, S., E. Grapengiesser, et al. (1999). "Voltage-dependent entry and generation of slow Ca<sup>2+</sup> oscillations in glucose-stimulated pancreatic beta-cells." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): E512-518.
- Dunne, M. J., E. A. Harding, et al. (1994). "Ion channels and the molecular control of insulin secretion." Biochem Soc Trans **22**(1): 6-12.
- Eizirik, D. L., A. K. Cardozo, et al. (2008). "The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus." Endocr Rev **29**(1): 42-61.
- Eliasson, L., X. Ma, et al. (2003). "SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells." J Gen Physiol **121**(3): 181-197.
- Feinshreiber, L., D. Singer-Lahat, et al. (2009). "Voltage-gated potassium channel as a facilitator of exocytosis." Ann N Y Acad Sci **1152**: 87-92.
- Ferrannini, E. und G. Mingrone (2009). "Impact of different bariatric surgical procedures on insulin action and beta-cell function in type 2 diabetes." Diabetes Care **32**(3): 514-520.
- Geng, X., L. Li, et al. (2007). "Antidiabetic sulfonylurea stimulates insulin secretion independently of plasma membrane KATP channels." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(1): E293-301.
- Gerber, S. H. und T. C. Südhof (2002). "Molecular determinants of regulated exocytosis." Diabetes **51 Suppl 1**: S3-11.
- Giani, G., H. U. Janka et al. (2000). "Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland." In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG. Scherbaum, W. A., Lauterbach, K. W., Renner, R. (Hrsg.). 1. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2000.

- Gilon, P., J. C. Jonas, et al. (1994). "Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets." Diabetologia **37**(10): 1007-1014.
- Gopel, S., T. Kanno, et al. (1999). "Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets." J Physiol **521 Pt 3**: 717-728.
- Gopel, S., Q. Zhang, et al. (2004). "Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans." J Physiol **556**(Pt 3): 711-726.
- Gopel, S. O., T. Kanno, et al. (1999). "Activation of Ca(2+)-dependent K(+) channels contributes to rhythmic firing of action potentials in mouse pancreatic beta cells." J Gen Physiol **114**(6): 759-770.
- Gotoh, M., T. Maki, et al. (1985). "An improved method for isolation of mouse pancreatic islets." Transplantation **40**(4): 437-438.
- Grodsky, G. M. (1989). "A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of beta-cell function?" Diabetes **38**(6): 673-678.
- Gryniewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Hatlapatka, K., M. Matz, et al. (2011). "Bidirectional insulin granule turnover in the submembrane space during K(+) depolarization-induced secretion." Traffic **12**(9): 1166-1178.
- Hatlapatka, K., A. Wienbergen, et al. (2009). "Selective enhancement of nutrient-induced insulin secretion by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-blocking imidazolines." J Pharmacol Exp Ther **331**(3): 1033-1041.
- Hatlapatka, K., M. Willenborg, et al. (2009). "Plasma membrane depolarization as a determinant of the first phase of insulin secretion." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E315-322.
- Haugland, R. P. (1992). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Molecular Probes, 5th edition, ed. Larison, K.D. 421 pp, Eugene, OR.
- Hauner, H. (1998). "Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland." Dtsch Med Wschr **123**: 777-782.

- Hellman, B. (1976). "Stimulation of insulin release after raising extracellular calcium." FEBS Lett **63**(1): 125-128.
- Hellman, B., E. Gylfe, et al. (1980). "Ca<sup>2+</sup> transport in pancreatic beta-cells during glucose stimulation of insulin secretion." Ups J Med Sci **85**(3): 321-329.
- Henquin, J. C. (1978). "D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells." Nature **271**(5642): 271-273.
- Henquin, J. C. (1980). "Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets." Diabetologia **18**(2): 151-160.
- Henquin, J. C. (1992). "The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work?" Diabetologia **35**(10): 907-912.
- Henquin, J. C. (2000). "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose." Diabetes **49**(11): 1751-1760.
- Henquin, J. C. und H. P. Meissner (1984). "Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells." Experientia **40**(10): 1043-1052.
- Horn, R. und A. Marty (1988). "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method." J Gen Physiol **92**(2): 145-159.
- Inagaki, N., T. Gonoj, et al. (1995). "Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor." Science **270**(5239): 1166-1170.
- Jacobson, Philipson - Action potentials and insulin secretion: new insights into the role of Kv channels, Diabetes, Obesity and Metabolism Volume 9, Issue SUPPL. 2, November 2007, Pages 89-98
- Jakob, I., I. A. Hauser, et al. (1998). "MDR1 in taste buds of rat vallate papilla: functional, immunohistochemical, and biochemical evidence." Am J Physiol **274**(1 Pt 1): C182-191.
- Juntti-Berggren, L., V. N. Civelek, et al. (1994). "Glucose-stimulated increase in cytoplasmic pH precedes increase in free Ca<sup>2+</sup> in pancreatic beta-cells. A possible role for pyruvate." J Biol Chem **269**(20): 14391-14395.
- Kahn, B. B. (1998). "Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance." Cell **92**(5): 593-596.
- Kahn, R., J. Buse, et al. (2005). "The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **28**(9): 2289-2304.

- Kanno, T., P. Rorsman, et al. (2002). "Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by K(ATP)-channel modulation." J Physiol **545**(Pt 2): 501-507.
- Kasten, F. H. (1993). "Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications." In: Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis; hrsg. v. Mason W. T.; San Diego, Academic Press, pp 12-31.
- Kerner, W., J. Brückel et al. (2004). "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG: Scherbaum W. A., Lauterbach K. W., Joost H. G. (Hrsg.).
- Lang, F. und P. Lang (2007). "Basiswissen Physiologie". 2. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Lebrun, P. und I. Atwater (1985). "Effects of the calcium channel agonist, BAY K 8644, on electrical activity in mouse pancreatic B-cells." Biophys J **48**(6): 919-930.
- Leech, C. A., I. Dzura, et al. (2011). "Molecular physiology of glucagon-like peptide-1 insulin secretagogue action in pancreatic beta cells." Prog Biophys Mol Biol **107**(2): 236-247.
- Lenzen, S. und U. Panten (1988). "Signal recognition by pancreatic B-cells." Biochem Pharmacol **37**(3): 371-378.
- Lenzen, S. und T. Peckmann (2001). "Effects of tolbutamide and N-benzoyl-D-phenylalanine (NBDP) on the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse pancreatic islets." Biochem Pharmacol **62**(7): 923-928.
- Lernmark, A. (1974). "The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets." Diabetologia **10**(5): 431-438.
- Lortz, S., E. Gurgul-Convey, et al. (2005). "Importance of mitochondrial superoxide dismutase expression in insulin-producing cells for the toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines." Diabetologia **48**(8): 1541-1548.
- MacDonald, P. E. und M. B. Wheeler (2003). "Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets." Diabetologia **46**(8): 1046-1062.
- Malaisse-Lagae, F., P. C. Mathias, et al. (1984). "Gating and blocking of calcium channels by dihydropyridines in the pancreatic B-cell." Biochem Biophys Res Commun **123**(3): 1062-1068.
- Malaisse, W. J. (1983). "Insulin release : the fuel concept." Diabete Metab **9**(4): 313-320.
- Malaisse, W. J. und A. C. Boschero (1977). "Calcium antagonists and islet function. XI. Effect of nifedipine." Horm Res **8**(4): 203-209.

- Malaisse, W. J., F. Malaisse-Lagae, et al. (1984). "Coupling factors in nutrient-induced insulin release." Experientia **40**(10): 1035-1043.
- Malaisse, W. J., A. Sener, et al. (1981). "The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Metabolic interaction of L-glutamine and 2-ketoisocaproate in pancreatic islets." Biochim Biophys Acta **677**(1): 39-49.
- Manzini, I. und D. Schild (2003). "Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles." J Physiol **546**(Pt 2): 375-385.
- Marchetti, P., M. Bugliani, et al. (2007). "The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients." Diabetologia **50**(12): 2486-2494.
- Martin, S. und H. Kolb (1998). "Pathogenese und Immuntherapie des Diabetes mellitus Typ-1." Diabetes und Stoffwechsel, 7: S. 17-24.
- Marty, A. und E. Neher (1983). "Tight-seal whole cell recording." In: Single-Channel Recording. B. Sakmann and E. Neher, editors, Plenum Publishing Corp., New York, NY 107-122.
- Matschinsky, F. M. (1996). "Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm." Diabetes **45**(2): 223-241.
- Matthaei, S. et al. (2011). "Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2." Diabetologie 2011. 6: S131–S136.
- Meglasson, M. D. und F. M. Matschinsky (1986). "Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion." Diabetes Metab Rev **2**(3-4): 163-214.
- Misler, S., K. Gillis, et al. (1989). "Modulation of gating of a metabolically regulated, ATP-dependent K<sup>+</sup> channel by intracellular pH in B cells of the pancreatic islet." J Membr Biol **109**(2): 135-143.
- Mitchell, P. und J. Moyle (1967). "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation." Nature **213**(5072): 137-139.
- Nadal, A., M. Valdeolmillos et al. (1994). "[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes induced by tolbutamide in single pancreatic islets." In: Insulin secretion and pancreatic B-cell research; hrsg. v. Flatt Ed PR, Lenzen S., Smith-Gordon, London; pp 237-241.
- Neher, E., A. Marty, et al. (1983). "Ionic channels for signal transmission and propagation." Prog Brain Res **58**: 39-48.
- Neher, E. und B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Newman, B., J. V. Selby, et al. (1987). "Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins." Diabetologia **30**(10): 763-768.

- Numberger, M. und A. Draguhn (1996): In: Patch-Clamp-Technik, hrsg. v. Labor im Fokus, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Ohta, M., J. Nelson, et al. (1993). "Effect of  $\text{Ca}^{++}$  channel blockers on energy level and stimulated insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans." J Pharmacol Exp Ther **264**(1): 35-40.
- Pal, A. und M. McCarthy (2012). "The genetics of type 2 diabetes and its clinical relevance." Clin Genet.
- Palitzsch, K.-D. und C. Bollheimer (2000). "Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2." In: Böhm, B.O., Palitzsch, K.-D., Rosak, C., Spinas, G.A., Hrsg. Klinische Diabetologie. Berlin: Springer; S.31-48.
- Panten, U., E. Kriegstein, et al. (1972). "Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets." FEBS Lett **20**(2): 225-228.
- Panten, U., M. Schwanstecher, et al. (1988). "Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **338**(4): 459-462.
- Philipson, L. H. (1999). "Beta-cell ion channels: keys to endodermal excitability." Horm Metab Res **31**(8): 455-461.
- Pugliese, A. (2012). "The multiple origins of Type 1 diabetes." Diabet Med.
- Rahier, J., Y. Guiot, et al. (2008). "Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **10 Suppl 4**: 32-42.
- Ravier, M. A., R. Cheng-Xue, et al. (2010). "Subplasmalemmal  $\text{Ca}^{2+}$  measurements in mouse pancreatic beta cells support the existence of an amplifying effect of glucose on insulin secretion." Diabetologia **53**(9): 1947-1957.
- Ravier, M. A., J. Sehlin, et al. (2002). "Disorganization of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and pulsatile insulin secretion in islets from ob/ obmice." Diabetologia **45**(8): 1154-1163.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-1607.
- Reaven, G. M. (2005). "Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease." Panminerva Med **47**(4): 201-210.
- Rink, T. J., R. Y. Tsien, et al. (1982). "Cytoplasmic pH and free  $\text{Mg}^{2+}$  in lymphocytes." J Cell Biol **95**(1): 189-196.

- Roe, M. W., M. E. Lancaster, et al. (1993). "Voltage-dependent intracellular calcium release from mouse islets stimulated by glucose." J Biol Chem **268**(14): 9953-9956.
- Roe, M. W., J. F. Worley, 3rd, et al. (1996). "Expression and function of pancreatic beta-cell delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. Role in stimulus-secretion coupling." J Biol Chem **271**(50): 32241-32246.
- Rorsman, P., F. M. Ashcroft, et al. (1988). "Single Ca channel currents in mouse pancreatic B-cells." Pflugers Arch **412**(6): 597-603.
- Rorsman, P., L. Eliasson, et al. (2011). "Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans." Prog Biophys Mol Biol **107**(2): 224-235.
- Rorsman, P. und E. Renstrom (2003). "Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells." Diabetologia **46**(8): 1029-1045.
- Rorsman, P. und G. Trube (1985). "Glucose dependent K<sup>+</sup>-channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP." Pflugers Arch **405**(4): 305-309.
- Rorsman, P. und G. Trube (1986). "Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions." J Physiol **374**: 531-550.
- Rubino, F. (2008). "Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis." Diabetes Care **31 Suppl 2**: S290-296.
- Rustenbeck, I. (2002). "Desensitization of insulin secretion." Biochem Pharmacol **63**(11): 1921-1935.
- Saegusa, N., E. Moorhouse, et al. (2011). "Influence of pH on Ca<sup>2+</sup>(+) current and its control of electrical and Ca<sup>2+</sup>(+) signaling in ventricular myocytes." J Gen Physiol **138**(5): 537-559.
- Saxena, R., L. Gianniny, et al. (2006). "Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals." Diabetes **55**(10): 2890-2895.
- Schuit, F. C., P. Huypens, et al. (2001). "Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus." Diabetes **50**(1): 1-11.
- Schulla, V., E. Renstrom, et al. (2003). "Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca<sub>v</sub>1.2 Ca<sup>2+</sup> channel null mice." EMBO J **22**(15): 3844-3854.
- Shepherd RM, Henquin JC. The role of metabolism, cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>, and pH-regulating exchangers in glucose-induced rise of cytoplasmic pH in normal mouse pancreatic islets. J Biol Chem. 1995 Apr 7;270(14):7915-21.

- Sigworth, F. J. (1986). "EPC-7 User`s Manual." List-Electronics, Darmstadt.
- Simpson, A. W. (1999). "Fluorescent measurement of  $[Ca^{2+}]_i$ . Basic practical considerations." Methods Mol Biol **114**: 3-30.
- Smith, P. A., F. M. Ashcroft, et al. (1990). "Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated  $K^{+}$ -currents in isolated mouse pancreatic beta-cells." FEBS Lett **261**(1): 187-190.
- Smith, P. A., K. Bokvist, et al. (1990). "Delayed rectifying and calcium-activated  $K^{+}$  channels and their significance for action potential repolarization in mouse pancreatic beta-cells." J Gen Physiol **95**(6): 1041-1059.
- Spinas, G. A. und R. Lehmann (2001). Der Diabetes mellitus: Diagnose, Klassifikation und Pathogenese, Curriculum, Schweiz Med Forum Nr. 20, 16. Mai 2001, S.519-525.
- St-Onge, L. und M. Wagner (2006). "Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen." Molekulare Medizin 2006, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 25-57.
- Straub, S. G. und G. W. Sharp (2004). "Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion." Am J Physiol Cell Physiol **287**(3): C565-571.
- Sturgess, N. C., M. L. Ashford, et al. (1985). "The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel." Lancet **2**(8453): 474-475.
- Trube, G., P. Rorsman, et al. (1986). "Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^{+}$  channel in mouse pancreatic beta-cells." Pflugers Arch **407**(5): 493-499.
- Tsushima, R. G. (2011). "Second-phase insulin secretion gets cool." Am J Physiol Endocrinol Metab **301**(6): E1070-1071.
- Ui, M. (1966). "A role of phosphofructokinase in pH-dependent regulation of glycolysis." Biochim Biophys Acta **124**(2): 310-322.
- Unger, R. H. und A. D. Cherrington (2012). "Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover." J Clin Invest **122**(1): 4-12.
- van Haefen, T. W. (2002). "Early disturbances in insulin secretion in the development of type 2 diabetes mellitus." Mol Cell Endocrinol **197**(1-2): 197-204.
- van Hoek, M., A. Dehghan, et al. (2008). "Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a population-based study." Diabetes **57**(11): 3122-3128.



- Walz, W. (1995). "Perforated Patch-Clamp Technique." In: Patch-Clamp Applications and Protocols, Neuromethods Volume 26 hrsg. Editors: Alan A. Boulton, Glen B. Baker, Wolfgang Walz, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp: 155-171.
- Willenborg, M., M. Belz, et al. (2012). "Ca(2+)-dependent desensitization of insulin secretion by strong potassium depolarization." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(2): E223-233.
- Willenborg, M., K. Hatlapatka, et al. (2011). "Studies of first phase insulin secretion using imposed plasma membrane depolarization." Front Biosci (Schol Ed) **3**: 662-679.
- Zhang, C. L., M. Katoh, et al. (2009). "The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs." Science **325**(5940): 607-610.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

% = Prozent

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  = cytosolische Calciumkonzentration

$[\text{pH}]_i$  = cytosolischer pH-Wert

$\lambda$  = Wellenlänge

°C = Grad Celsius

$\mu\text{g}$  = Mikrogramm ( $10^{-6}$  g)

$\mu\text{l}$  = Mikroliter ( $10^{-6}$  l)

$\mu\text{m}$  = Mikrometer ( $10^{-6}$  m)

$\mu\text{S}$  = Mikrosiemens

ADA = American Diabetes Association

AM = Acetoxymethyl-

Aqua bidest. = zweifach destilliertes Leitungswasser

ATP = Adenosin-5'-triphosphat

BSA = bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)

bzw. = beziehungsweise

ca. = circa

cAMP = zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat

cm = Zentimeter

$\text{CO}_2$  = Kohlenstoffdioxid

BAY K8644 = (+/-)-1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-1-[(2-nitrophenyl)methyl]-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-3-pyridincarboxylsäuremethylester

BCECF-AM = 2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein

d = Durchmesser

Da = Dalton

d.h. = das heißt

dl = Deziliter

DMSO = Dimethylsulfoxid

EGTA = Ethylenglykol-bis-( $\beta$ -amino-ethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure

Epac2 = exchange protein directly activated by cAMP 2

etc. = et cetera

EZ = extrazelluläre Lösung

Fa. = Firma

FADH<sub>2</sub> = reduziertes Flavin-Adenin-Dinucleotid

FCS = fötales Kälberserum

GLP-1 = glucagon-like peptide 1

GLUT-1/2 = Glucosetransporter, Subtyp 1 oder 2

g = Gramm

(x) g = Zentrifugalkraft ( $m / s^2$ )

h = Stunde

HEPES = [4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure

Hz = Hertz

IU = Internationale Einheit (international unit)

K<sub>ATP</sub>-Kanal = ATP-sensitiver Kaliumkanal

K<sub>D</sub> = Dissoziationskonstante

K<sub>ir</sub>6.2 = einwärtsgleichrichtender (inward rectifier) Kaliumkanal, Subtyp 6.2

KR = Krebs-Ringer

l = Liter

mm = Millimeter

mg = Milligramm

mM =  $10^{-3}$  mol/l (Millimolar)

mmol =  $10^{-3}$  mol/l (Millimolar)

mV =  $10^{-3}$  V (Millivolt)

min = Minute

M<sub>r</sub> = relative Molekülmasse

MgADP = Magnesium-Adenosindiphosphat

mACh = muskarinischer Acetylcholin

N = Normal

n = Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente

NADH = reduziertes Nicotinamid-Adenosindinucleotid

nm = Nanometer

NMRI = Naval medical research institute (USA)

O<sub>2</sub> = Sauerstoff

PKA/PKC = Proteinkinase A/C

pA = 10<sup>-9</sup> Ampere (Picoampere)

pF = 10<sup>-9</sup> Farad (Picofarad)

ROI = region of interest

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

s = Sekunde

SEM = Standardfehler der Mittelwerte (Standard Error of Means)

SNAP25 = Synaptosomal-associated protein 25

SNARE = soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

sog. = sogenannt

SUR1 = Sulfonylurea receptor (Sulfonylharnstoff-Rezeptor), Subtyp 1

U/min = Umdrehungen pro Minute

u.a. = unter anderem

v.a. = vor allem

v/v = Volumenanteile bezogen auf das Gesamtvolumen

z.B. = zum Beispiel

z.T. = zum Teil